

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis**

**Jéssica Pereira de Matos**

**FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE HIDROLISADO ÁCIDO OBTIDO DA TORTA  
DE GIRASSOL UTILIZANDO AS LINHAGENS *Galactomyces geotrichum* UFVJM-  
R10 E *Candida akabanensis* UFVJM-R131**

**Diamantina**

**2017**



**Jéssica Pereira de Matos**

**FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE HIDROLISADO ÁCIDO OBTIDO DA TORTA  
DE GIRASSOL UTILIZANDO AS LINHAGENS *Galactomyces geotrichum* UFVJM-  
R10 E *Candida akabanensis* UFVJM-R131**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Biocombustíveis.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lílian de Araújo Pantoja  
Coorientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Alexandre Soares dos Santos

**Diamantina**

**2017**

Ficha Catalográfica - Sistema de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecária: Jullyele Hubner Costa CRB-6/2972

M433f Matos, Jéssica Pereira de.  
2017 Fermentação alcoólica de hidrolisado ácido obtido da torta de girassol utilizando as linhagens *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 e *Candida akabensis* UFVJM-R131 / Jéssica Pereira de Matos. – Diamantina, 2017.  
92 p. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Lilian de Araújo Pantoja  
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis) –Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. Etanol hemicelulósico. 2. Pentoses. 3. Leveduras. 4. Inibidores. 5. Bioprocesso. I. Pantoja, Lilian de Araújo. II. Santos, Alexandre Soares dos. III. Título.

**CDD 660.6**

Elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

JÉSSICA PEREIRA DE MATOS

**FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA DE HIDROLISADO ÁCIDO OBTIDO DA  
TORTA DE GIRASSOL UTILIZANDO AS LINHAGENS *Galactomyces*  
*geotrichum* UFVJM-R10 E *Candida akabanensis* UFVJM-R131**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Biocombustíveis.

Orientador : Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lilian De Araujo Pantoja

Data da aprovação : 19/05/2017

---

Dr.<sup>a</sup> Ana Paula de Figueiredo Conte Vanzéla  
UFVJM

---

Dr.<sup>a</sup> Verônica Ferreira Melo  
IFRJ

---

Dr. Ronnie Von Dos Santos Veloso  
UFVJM

---

Dr.<sup>a</sup> Lilian de Araujo Pantoja  
UFVJM

DIAMANTINA



*“Para adquirir conhecimento, é preciso estudar;  
mas para adquirir sabedoria, é preciso observar.”*

*(Marilyn vos Savant)*





## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, que me deu saúde e força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, Odir e Célia Regina (*in memoriam*), pelo amor, educação e direcionamento.

Aos meus tios, Maggi Salete e Onílio Júnior, e a minha avó, Nilza, pelo amor incondicional, apoio e auxílio durante essa árdua jornada. Sem vocês, a caminhada seria mais difícil, talvez nem se completasse!

A todos os meus familiares, pelo apoio e incentivo.

Aos meus orientadores, Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Alexandre Soares e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lílian Pantoja, pelos ensinamentos profissionais e pela confiança depositada em mim.

Agradeço a UFVJM pelo apoio estrutural e pedagógico.

A empresa BIOSEP, que cedeu a torta de girassol para realização deste trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, por todo embasamento teórico e prático e a todos os colegas do Programa.

Agradeço a toda equipe do LabBBio e parceiros de jornada, em especial a Manassés, Ilva, Camila, Bruna e Fidel, pelas contribuições e auxílios durante o meu trabalho.

Por fim, a todos os amigos.

Muito obrigada!



## RESUMO

Na produção do bioetanol lignocelulósico, as hexoses provenientes da celulose são fermentadas a etanol por muitos micro-organismos que ocorrem naturalmente. Entretanto, as pentoses, provenientes da hidrólise da hemicelulose, como xilose e arabinose, são fermentadas a etanol por poucas espécies selvagens conhecidas e com baixos rendimentos. Há, portanto, necessidade de seleção de estirpes de leveduras que sejam capazes de fermentar pentoses e glicose conjuntamente e de forma eficiente. Neste estudo, duas linhagens de leveduras, *Candida akabanensis* UFVJM-R131 e *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, foram avaliadas na fermentação alcoólica da fração hemicelulósica de torta de girassol solubilizada por hidrólise com ácido diluído. A hidrólise da hemicelulose foi realizada misturando-se 31% de biomassa seca em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 6%, que foi mantida por 38 minutos a temperatura de  $121^\circ\text{C}$  a 1 atm. A caracterização cromatográfica do hidrolisado obtido revelou a existência de glicose ( $7,57 \text{ g L}^{-1}$ ), xilose ( $19,53 \text{ g L}^{-1}$ ) e arabinose ( $8,85 \text{ g L}^{-1}$ ), além de 5-hidroximetilfurfural ( $0,71 \text{ g L}^{-1}$ ), furfural ( $0,05 \text{ g L}^{-1}$ ) e ácido acético ( $5,27 \text{ g L}^{-1}$ ). Ambas as leveduras mostraram-se capazes de produzir etanol a partir do hidrolisado ácido da torta de girassol. Os processos conduzidos com as leveduras *G. geotrichum* UFVJM-R10 e *C. akabanensis* UFVJM-R131 apresentaram valores de  $Y_{P/S}$  de 0,29 e 0,27  $\text{g}_{\text{etanol}} \text{g}^{-1}_{\text{açúcares}}$ , respectivamente. As quantidades dos inibidores identificados no hidrolisado não afetaram a eficiência da fermentação alcoólica. A suplementação do hidrolisado com fontes de nitrogênio e minerais aumentou a taxa de consumo da xilose e da arabinose. Os resultados obtidos permitiram concluir que as linhagens *G. geotrichum* UFVJM-R10 e *C. akabanensis* UFVJM-R131 possuem potencial para a produção de bioetanol a partir da fração hemicelulósica de biomassas vegetais.

**Palavras chave:** etanol hemicelulósico, pentoses, leveduras, inibidores, bioprocessos.



## ABSTRACT

In the production of bioethanol lignocellulosic, the hexose from cellulose are fermented to ethanol by many microorganisms that occur naturally. Though, the pentoses from hemicellulose hydrolysis, as xylose and arabinose, are fermented to ethanol by few known wild strains. This fact point the need to select strains of yeasts capable of ferment pentoses and glucose together more efficiently. In the present study, two lineages of yeast, *Candida akabanensis* UFVJM-R131 and *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10, were evaluated on alcoholic fermentation of hemicellulosic fraction from sunflower cake solubilized by hydrolysis with dilute acid. The hydrolysis of hemicellulose was performed utilizing 31% of dry biomass in  $\text{H}_2\text{SO}_4$  at 6% under  $121^\circ\text{C}$  and pressure at 1 atm for 38 minutes. Chromatographic characterization of the hydrolyzate obtained showed the presence of glucose ( $7.57 \text{ g L}^{-1}$ ), xylose ( $19.53 \text{ g L}^{-1}$ ) and arabinose ( $8.85 \text{ g L}^{-1}$ ), besides 5-hydroxymethylfurfural ( $0.71 \text{ g L}^{-1}$ ), furfural ( $0.05 \text{ g L}^{-1}$ ) and acetic acid ( $5.27 \text{ g L}^{-1}$ ). Both yeasts were able to produce ethanol from the acidic hydrolyzate. The fermentation carried out with *G. geotrichum* UFVJM-R10 and *C. akabanensis* UFVJM-R131 presented  $Y_{P/S}$  values of 0.29 and 0.27  $\text{g}_{\text{ethanol}} \text{g}_{\text{sugars}}^{-1}$ , respectively. The amounts of the inhibitors identified in the hydrolyzate did not affect the efficiency of the alcoholic fermentation. The supplementation of the hydrolyzate with nitrogen and mineral sources increased the rate of consumption of xylose and arabinose. The results obtained allowed to conclude that the strains *G. geotrichum* UFVJM-R10 and *C. akabanensis* UFVJM-R131 have potential for the production of bioethanol from vegetal hemicellulosic fraction.

**Keywords:** Hemicellulosic ethanol, pentoses, yeasts, inhibitors, bioprocess.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Esquema ilustrativo da estrutura lignocelulósica da biomassa vegetal.....	24
Figura 2 - Estrutura química da celulose.....	25
Figura 3 - Estrutura das hemiceluloses glucoronoarabinosilana, glucuronoxilana e galactomanana.....	26
Figura 4 - Estrutura química dos precursores primários da macromolécula de lignina.....	27
Figura 5 - Esquema dos pré-tratamentos na estrutura da biomassa lignocelulósica.....	30
Figura 6 - Esquema geral dos principais inibidores gerados a partir do material lignocelulósico durante o pré-tratamento ácido.....	35
Figura 7 - Esquema dos principais inibidores originados da degradação da fração hemicelulósica e seus principais efeitos na célula.....	37
Figura 8 – Conversão dos monossacarídeos provenientes da fração hemicelulósica a etanol na célula leveduriformes.....	41
Figura 9 - Fluxograma das etapas metodológicas de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de torta de girassol empregando linhagens fermentadoras de pentoses.....	43
Figura 10 - Curva analítica de glicose utilizada para dosagem de açúcares solúveis totais (AST) e Amido.....	50
Figura 11 - Curva analítica de glicose utilizada para dosagem de açúcares redutores (AR)....	51
Figura 12 - Representação esquemática da obtenção dos ensaios fermentativos sem suplementação (Hidrolisado) e com suplementação de sais, utilizando as linhagens <i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R10 e <i>Candida akabanensis</i> UFVJM-R131.....	53
Figura 13 - Perfil do consumo de do glicerol, ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) pelas leveduras <i>G. geotrichum</i> UFVJM-R10 (A e C) e <i>C. akabanensis</i> UFVJM-R131 (B e D) nos sistemas fermentativos com o hidrolisado hemicelulósico de torta de girassol não suplementado (A e B) e suplementado (C e D).....	62
Figura 14 - Perfil do crescimento celular baseado na leitura direta da densidade óptica ( $D.O_{600nm}$ ) das linhagens <i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R10 e <i>Candida akabanensis</i> UFVJM-R131 durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico da torta de girassol não suplementada (A) e suplementada (B).....	64
Figura 15 - Perfil cromatográfico dos açúcares, álcoois e inibidores provenientes da amostra utilizando o meio hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de girassol suplementado com	

nutrientes, empregando como agente fermentativo, a linhagem *Candida akabanensis* R131,  
com tempo de 24 horas de fermentação incubado a 28°C.....65



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Biomassas lignocelulósicas utilizadas na produção de bioetanol de segunda geração empregando diferentes estratégias de pré-tratamentos e agentes fermentativos.....	28
Tabela 2 - Efeito de diferentes pré-tratamentos usados em materiais lignocelulósicos.....	32
Tabela 3 - Composição físico-química da torta de girassol ( <i>Helianthus annuus</i> L.).....	57
Tabela 4 - Composição química da torta de girassol antes e após o pré-tratamento químico com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 6%.....	59
Tabela 5 - Composição química do hidrolisado ácido hemicelulósico proveniente da torta de girassol após o pré-tratamento químico com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 6%.....	59
Tabela 6 - Concentração dos compostos presentes no hidrolisado ácido hemicelulósicos elaborado com meio suplementado e não suplementado, antes e após a fermentação.....	63
Tabela 7 - Parâmetros dos processos fermentativos conduzidos com as linhagens leveduriformes <i>G. geotrichum</i> UFVJM-R10 e <i>C. akabanensis</i> UFVJM-R131 e o hidrolisado hemicelulósico de torta de girassol não suplementado e suplementado.....	68



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AST	- Açúcares solúveis totais
AR	- Açúcares redutores
ATP	- Adenosina trifosfato
BOD	- <i>Biochemical oxygen demand</i>
D.O	- Densidade óptica
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CHNS/O	- Carbono, Hidrogênio, Nitrogênio, Enxofre / Oxigênio
DNA	- <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNS	- Ácido dinitrosalicílico
Ef%	- Eficiência fermentativa em porcentagem
ERO	- Espécies reativas de oxigênio
FDA	- Fibra em detergente ácido
FDN	- Fibra em detergente neutro
HAH	- Hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de girassol
HAHCS	- Hidrolisado ácido com suplementação
HAHSS	- Hidrolisado ácido sem suplementação
5-HMF	- 5-hidroximetilfurfural
NAD <sup>+</sup>	- <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i> – oxidado
NADH	- <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i> – reduzido
ND	- Não detectado
Qp	- Produtividade volumétrica
S/L	- Sólido/Líquido
UV	- Radiação ultravioleta
YMPD	- <i>Yeast malt powered dextrose</i>
Y <sub>P/S</sub>	- Rendimento em etanol
YT	- Fator de rendimento teórico



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>24</b>
3.1 Biomassas lignocelulósicas e Bioetanol de segunda geração.....	24
3.2 Pré- tratamentos e hidrólise de materiais lignocelulósicos.....	30
3.3 Subprodutos da hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos.....	34
3.4 Efeito dos compostos inibidores da fração hemicelulósica sobre a fermentação.....	36
3.5 Leveduras fermentadoras de pentoses.....	38
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
4.1 Obtenção e preparo da torta de girassol.....	43
4.2 Caracterização físico-química da biomassa lignocelulósica (torta de girassol).....	44
4.2.1 Umidade.....	44
4.2.2 Cinzas.....	44
4.2.3 Proteínas totais.....	45
4.2.4 Lipídeos totais ou Extrato etéreo.....	45
4.2.5 Fibra em detergente neutro (FDN).....	46
4.2.6 Fibra em detergente ácido (FDA).....	46
4.2.7 Celulose.....	47
4.2.8 Lignina.....	47
4.2.9 Hemicelulose.....	48
4.2.10 Fibra bruta.....	48
4.2.11 Amido e açúcares solúveis totais (AST).....	49
4.2.11.1 Preparo da amostra.....	49
4.2.11.2 Quantificação do teor de amido e açúcares solúveis totais (AST).....	49
4.3 Obtenção da fração hemicelulósica da torta de girassol por hidrólise química.....	50
4.3.1 Concentrações de açúcares redutores (AR).....	51

<i>4.3.2 Análise química do hidrolisado ácido hemicelulósico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....</i>	<i>52</i>
<b>4.4 Preparo do inóculo das linhagens fermentadoras de pentoses.....</b>	<b>52</b>
<b>4.5 Processo fermentativo da fração hemicelulósica da torta de girassol.....</b>	<b>53</b>
<i>4.5.1. Fator de rendimento de produção de etanol (<math>y^{\frac{P}{S}}</math>).....</i>	<i>54</i>
<i>4.5.2 Produtividade volumétrica de etanol (<math>Q_p</math>).....</i>	<i>54</i>
<i>4.5.3 Eficiência Fermentativa (<math>E_f</math>).....</i>	<i>55</i>
<b>4.6 Análises estatística.....</b>	<b>55</b>
 <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	 <b>57</b>
 <b>6 CONCLUSÃO.....</b>	 <b>71</b>
 <b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	 <b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A crescente procura por novos recursos energéticos alternativos e sustentáveis torna-se cada vez mais importante, devido a fatores indicativos de uma possível escassez futura dos combustíveis fósseis não renováveis como o petróleo, o carvão e o gás natural (HOŞGÜN *et al.*, 2017). Nas últimas décadas os relatos apontam o etanol de biomassa lignocelulósica como um dos melhores combustíveis alternativos para o setor de transporte (SHUAI *et al.*, 2010; NASEERUDDIN; DESAI; RAO, 2017; UDEH & ERKURT, 2017; VAITHANOMSAT; CHUICHULCHERM; APIWATANAPIWAT, 2009), não só por contribuir para redução da emissão de gases do efeito estufa e apresentar baixo custo, mas também, por não afetar a segurança alimentar mediante a possibilidade de uso de resíduos de biomassas agroindustriais (CANABARRO *et al.*, 2017; GOTO & KAMIYA, 2016).

No que tange o uso das biomassas vegetais e dentre a vasta variedade existente, o girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma das culturas que está em destaque nos últimos anos, seja pela produção de grãos, pela produção de óleo comestível, ou ainda, pelo seu emprego como matéria-prima para a fabricação do biodiesel (NAUREEN *et al.*, 2015; ANTONOPOULOU *et al.*, 2015). Na fase final do processamento de obtenção do óleo, são originados subprodutos denominados de torta e farelo, que possuem alto teor de matéria orgânica celulósica e hemicelulósica, que podem ser utilizados como matéria-prima de baixo custo para gerar produtos com alto valor agregado, como o bioetanol de segunda geração (CAMARGO *et al.*, 2014). Entretanto, a viabilidade econômica e a comercialização do bioetanol têm como requisito indispensável a utilização de todos os polissacarídeos presentes na fibra celulósica e hemicelulósica dessas biomassas (CAMARGO *et al.*, 2014; PÉREZ-PIMIENTA *et al.*, 2017). Neste contexto, devido à recalcitrância do material lignocelulósico, a aplicação de pré-tratamento adequado na etapa de hidrólise é um passo essencial para a obtenção dos açúcares fermentescíveis, além do que, essa etapa gera um considerável impacto em todos os passos subsequentes da produção do bioetanol (ALVIRA *et al.*, 2010; GUPTA & VERMA, 2015; SMUGA-KOGUT *et al.*, 2017). Sendo assim, a conversão efetiva dos resíduos agrícolas a açúcares e a sua recuperação, pode ser considerada como a chave para o sucesso desta tecnologia (CANABARRO *et al.*, 2017).

Nas últimas décadas, diferentes métodos de pré-tratamento foram sugeridos para a conversão da fração hemicelulósica em açúcares fermentescíveis. Dentre estes, estão aqueles que empregam ácido diluído ou álcalis, os quais já são considerados uma das tecnologias mais maduras para este processo (GOTO & KAMIYA 2016; ZHANG; PEI; WANG, 2016). O

emprego de ácido diluído é a técnica mais utilizada em pesquisas para conversão da fração hemicelulósica e proporciona um hidrolisado rico em pentoses, principalmente D-xilose e L-arabinose (CAMARGO *et al.*, 2014; MARTÍNEZ-PATIÑO *et al.*, 2017; MENON & RAO, 2012). Mas, embora os objetivos do pré-tratamento ácido sejam biodisponibilizar a celulose e fracionar os principais componentes da matéria-prima, esse pré-tratamento envolve frequentes reações secundárias que resultam em subprodutos derivados da biomassa, os quais são inibitórios aos processos bioquímicos subsequentes (IBRAHEEM & NDIMBA, 2013; JONSSON & MARTÍN, 2016).

Desta forma, na etapa de fermentação a partir de produtos lignocelulósicos, um dos desafios para a eficiente produção de etanol é o uso de micro-organismos capazes de fermentar as pentoses liberadas no processo de hidrólise, além da glicose, e produzir bioetanol, mesmo na presença de inibidores gerados na etapa de pré-tratamento (LISOV *et al.*, 2017; SCHWARTZ & LAWOKO, 2010; OSIRO *et al.*, 2017).

Embora a espécie *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* seja considerada o biocatalizador mais eficiente no processo de conversão de pentoses a etanol, promovendo boas taxas de rendimento no processo (SILVA *et al.*, 2014; PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986), esta espécie ainda não satisfaz todas as características de um micro-organismo ideal para a fermentação de etanol lignocelulósico. Pois esta espécie não tolera completamente os inibidores presentes em hidrolisados lignocelulósicos (NASEERUDDIN; DESAI; RAO, 2017; NIGAM, 2001). Sendo assim, um dos principais desafios para o custo-benefício da produção do etanol lignocelulósico é a disponibilidade de micro-organismos robustos capazes de fermentar eficientemente todos os açúcares existentes no hidrolisado lignocelulósico, mesmo que na presença de inibidores (CADETE *et al.*, 2016; NOGUÉ & KARHUMAA, 2015).

O registro de micro-organismos que fermentam pentoses com eficiência, para fins de produção de bioetanol na presença de inibidores, ainda é incipiente, fazendo-se necessária a busca por novas linhagens que possuam tais características. Dentre as linhagens fermentadoras de pentoses, têm-se as linhagens *Candida akabanensis* e *Galactomyces geotrichum* que fermentam D-xilose a etanol, todavia, na literatura não há registro da sua aplicação para produção de bioetanol. Neste contexto, o presente estudo tem os objetivos apresentados a seguir.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficiência da produção de etanol a partir da fração hemicelulósica da torta de girassol utilizando as linhagens *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 e *Candida akabanensis* UFVJM-R131 fermentadoras de pentoses.

### 2.2 Objetivos Específicos

- I. Avaliar o potencial das linhagens *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 e *Candida akabanensis* UFVJM-R131 na produção de etanol em meio hemicelulósico com e sem suplementação de sais;
- II. Analisar a capacidade fermentativa das linhagens *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 e *Candida akabanensis* UFVJM-R131 frente aos inibidores formados na etapa de pré-tratamento da torta de girassol;
- III. Caracterizar e comparar a torta de girassol quanto aos seus aspectos físico-químicos antes e após o pré-tratamento por ácido diluído.



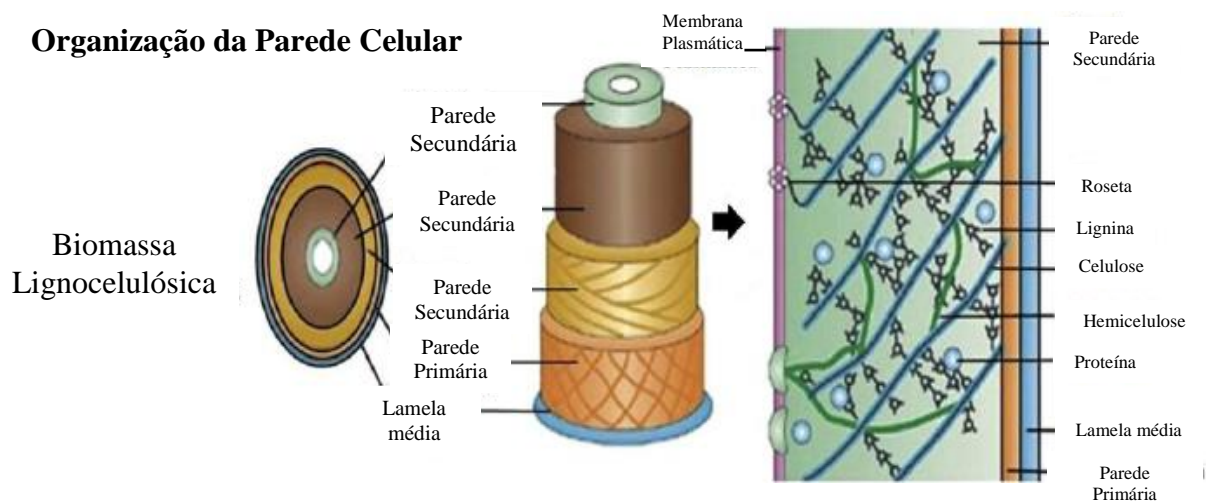
### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Biomassas lignocelulósicas e Bioetanol de segunda geração

A atual conjuntura da demanda energética, como consequência de um possível esgotamento dos recursos petrolíferos, bem como, a crescente preocupação com as alterações climáticas, associada à queima dos combustíveis fósseis, tem impulsionado a procura e o desenvolvimento de novas fontes energéticas como alternativas à energia fóssil (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2017; ZUCARO *et al.*, 2016). Neste sentido, a biomassa lignocelulósica é uma das matérias-primas mais promissoras para a produção de biocombustíveis, devido sua ampla biodisponibilidade e baixo valor econômico (FAVARO *et al.*, 2013). Além disso, essas matérias-primas são derivadas de culturas não alimentares ou de resíduos agrícolas, o que evita a competição direta com fontes alimentares e a disputa pelas terras agricultáveis, uma problemática observada na produção dos biocombustíveis de primeira geração (SINGH; MAHANTA; BORA, 2017; ZUCARO *et al.*, 2016).

A composição estrutural da biomassa lignocelulósica inclui uma complexa cadeia composta por carboidratos, proteínas, sais minerais e compostos fenólicos (LEITÃO, 2015; DOMÍNGUEZ *et al.*, 2017). Estas moléculas interagem intimamente umas com as outras na construção da parede celular dos vegetais (FIG.1), na qual se encontram fortemente entrelaçadas através de ligações covalentes e não covalentes (SUN *et al.*, 2011).

**Figura 1-** Esquema ilustrativo da estrutura lignocelulósica da biomassa vegetal

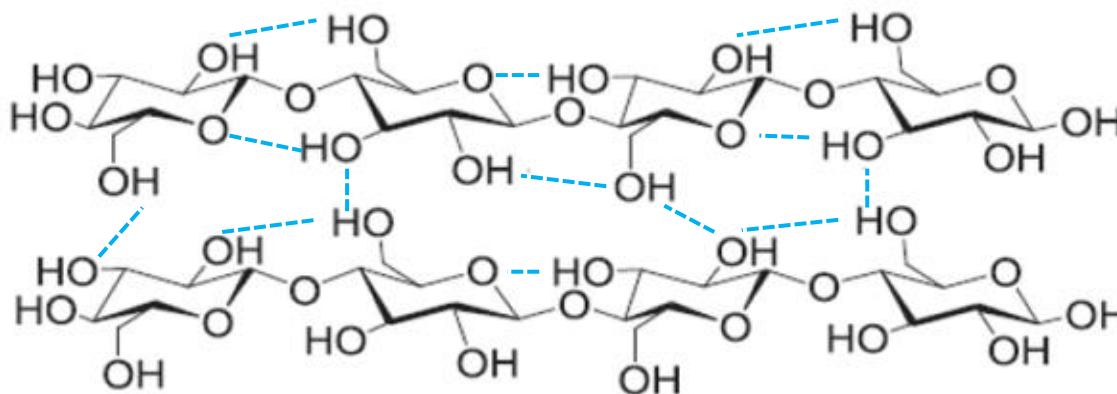


**Fonte:** SIQUEIRA (2015), adaptado de MENON; RAO (2012).

Os três principais componentes da biomassa lignocelulósica são: a celulose, hemiceluloses (também chamadas de polioses) e a lignina, sendo a proporção relativa dos três componentes dependente da espécie em questão (SÁ; CAMAROTAN; FERREIRA-LEITÃO, 2014).

A celulose é o componente mais abundante da parede celular vegetal, e trata-se de um polímero linear constituído de unidades repetitivas de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. Este componente é estabilizado por ligações de hidrogênio intermoleculares, possuindo ainda uma forte tendência em formar ligações de hidrogênio intramoleculares, fato que contribui para o aumento da sua rigidez e a faz altamente insolúvel e resistente à maior parte dos solventes orgânicos (SIQUEIRA, 2015; TEIXEIRA; SIQUEIRA; RYHÁRA, 2016). Cada unidade de repetição desta molécula contém três grupos hidroxilas, as quais estão ligadas em rede com unidades adjacentes através das ligações de hidrogênio (FIG. 2). Essa disposição torna a estrutura da celulose cristalina e amorfa formando fibras que garantem a estabilidade da molécula (SUN *et al.*, 2011).

**Figura 2-** Estrutura química da celulose

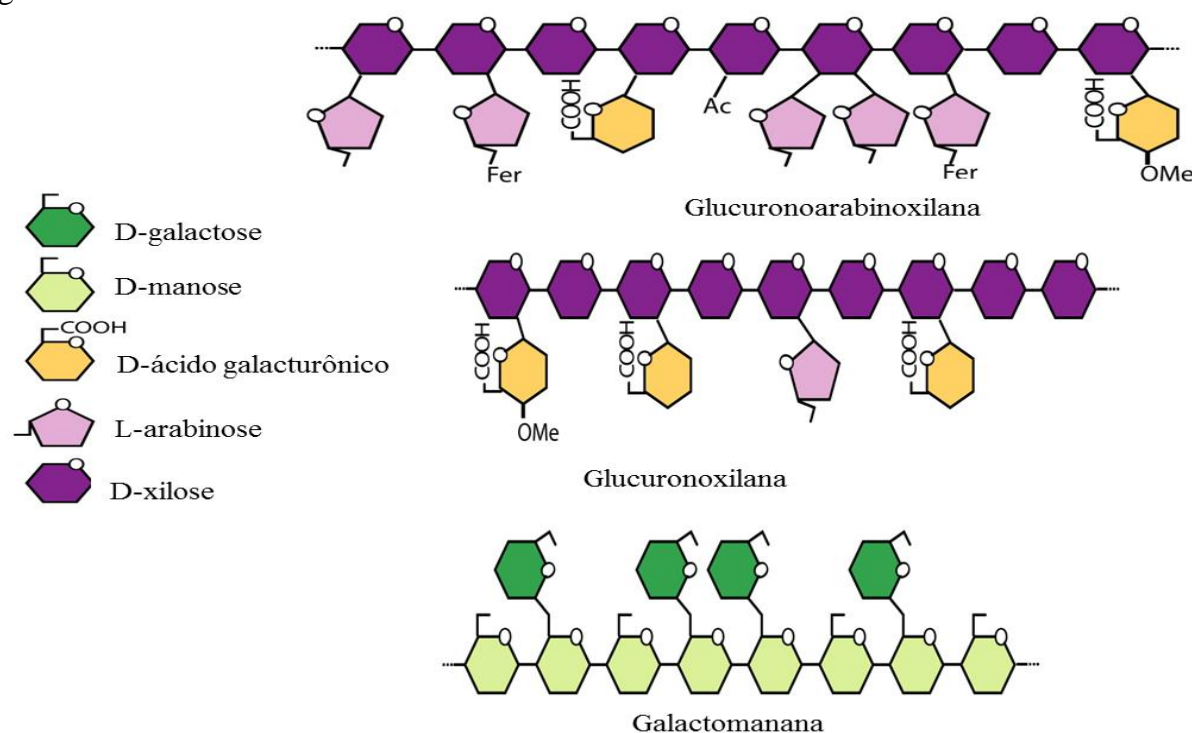


**Fonte:** NEGAHDAR; DELIDOVICH; PALKOVITS (2016).

As hemiceluloses ou polioses compreendem um grupo heteropolissacarídeo ramificado (FIG. 3), compostos por D-glicose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico, que se ligam à superfície das microfibrilas de celulose através das ligações de hidrogênio e a lignina, através de ligações covalentes (LEITÃO, 2015; RAVINDRAN & JAISWAL, 2016). Esse polissacarídeo possui funções variadas nas plantas, funcionando como mecanismo de defesa, reserva de carbono, bem como, contribui na sustentação e transporte de nutrientes e água (BUCKERIDGE; CAVALARI; SILVA, 2008). De acordo com os monômeros apresentados, as hemiceluloses

podem ser classificadas como xilanas (unidades de  $\beta$ -1,4-D-xilose ligadas), mananas (unidades de  $\beta$ -1,4-D-manose ligadas), galactanas (unidades de  $\beta$ -1,3-D-galactose ligadas) e arabinanas (unidades de  $\alpha$ -1,5-arabinose ligadas), sendo a primeira a mais abundante (GANDINI & BELGACEM, 2008). A sua configuração ramificada, torna a estrutura das hemiceluloses irregular, conferindo ausência de cristalinidade, motivo pelo qual absorve água facilmente, aumentando a flexibilidade do agregado e podendo diminuir a recalcitrância do polímero (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014).

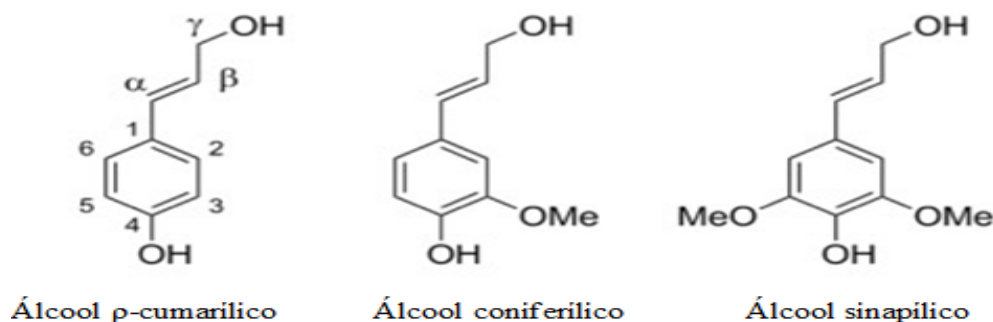
**Figura 3-** Estrutura das hemiceluloses glucuronoarabinoxilana, glucuronoxilana e galactomanana.



Fonte: Adaptado de SCHELLER & ULVSKOV (2010).

A lignina é um heteropolímero complexo tridimensional, amorfo e altamente ramificado constituído essencialmente por fenilpropanóides e por inúmeros grupos aromáticos e alifáticos, possuindo três precursores primários, o álcool  $p$ -cumarílico; o álcool coniferílico e o álcool sinapílico (FIG. 4) (ANWARA; GULFRAZ; IRSHAD, 2014; CHEN & WAN, 2017). Por se comportar como uma rede tridimensional insolúvel e ligar-se a outros componentes da parede celular, a lignina desempenha um papel importante na resistência, rigidez, impermeabilidade e desenvolvimento da célula. Além disso, atua como ligante entre as células, criando um material composto que tem uma notável resistência ao impacto, compressão e flexão (GORDOBIL *et al.*, 2016; SHAHZADI *et al.*, 2014).

**Figura 4** – Estrutura química dos precursores primários da macromolécula de lignina



Fonte: CHEN & WAN (2017).

Dos componentes estruturais encontrados nas biomassas lignocelulósicas, a celulose e a hemicelulose se destacam como elementos promissores para a produção de biocombustíveis, pois podem ser convertidos a carboidratos monoméricos (D-glicose, D-xilose e L-arabinose) e, então, convertidos a bioetanol de segunda geração (VORHA *et al.*, 2014). Entretanto, as composições químicas e estruturais básica das biomassas são altamente variáveis, pois dependem dos tipos de interações do vegetal, influências ambientais e alterações genéticas. Esse fato interfere na eficiência da produção dos biocombustíveis durante o processo de bioconversão, pois, podem afetar e influenciar nos rendimentos finais do produto (MATOS *et al.*, 2014; VORHA *et al.*, 2014).

A tecnologia para a produção do etanol a partir de açúcares simples e amido (bioetanol de primeira geração) está bem definida, no entanto, a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica (bioetanol de segunda geração) ainda requer extensa pesquisa para desenvolver um método viável de produção, principalmente, no que tange ao uso da fração hemicelulósica da biomassa, que continua a ser um grande desafio (KAMOLDEEN *et al.*, 2017; NASEERUDDIN; DESAI; RAO, 2017).

De acordo com a União da Indústria da Cana-de-açúcar (UNICA), as projeções da Conferência das Nações Unidas sobre Comércio e Desenvolvimento (UNCTAD) indicam que o Brasil tem potencial para produzir, pelo menos, 10 bilhões de litros de etanol de segunda geração até 2025, tendo em vista, que em 2016 a capacidade instalada do país era em torno de 177,3 milhões de litros (UNICA, 2017). Atualmente, a Granbio e a Raízen, são as duas empresas que possuem usinas de etanol celulósico em funcionamento no Brasil. Essas usinas utilizam o bagaço e palha de cana-de-açúcar como biomassa e estabelecem uma atuação competitiva, entretanto, apesar de pouco divulgado, suas dificuldades e perspectivas de produção giram em torno de obstáculos tecnológicos do processo, os quais necessitam ainda

de redução dos custos dos processos, bem como, aumento da eficiência de produção, proporcionando assim melhor rentabilidade do bioetanol de segunda geração (GRANBIO, 2017; RAIZEN, 2017).

O bioetanol de segunda geração, de forma concisa, é formado por quatro etapas básicas: (I) pré-tratamento para desorganizar a estrutura lignocelulósica, (II) hidrólise enzimática para produzir açúcares fermentescíveis, (III) fermentação alcoólica dos açúcares livres (hexoses e pentoses) a partir da ação de micro-organismos e (IV) destilação para recuperação do etanol propriamente dito (AGUILAR-REYNOSA *et al.*, 2017; ZHUANG *et al.*, 2016). Entretanto, para uma eficiente condução dos processos de obtenção do bioetanol de segunda geração é necessário o uso de diferentes estratégias, seja na etapa de pré-tratamento ao escolher o método mais adequado para desfazer a estrutura lignocelulósica, ou ainda, na etapa de fermentação ao selecionar o agente fermentativo (TAB. 1) (VORHA *et al.*, 2014; ZHANG; PEI; WANG, 2016).

**Tabela 1** - Biomassas lignocelulósicas utilizadas na produção de bioetanol de segunda geração empregando diferentes estratégias de pré-tratamentos e agentes fermentativos

Biomassa	Pré-tratamento	Agente Fermentativo	Eficiência Fermentativa (%)	Referência
Resíduo de Algoroba ( <i>Prosopis juliflora</i> )	Alcalino, ácido e enzimático	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Pichia stipitis</i>	87	Naseeruddin <i>et al.</i> , 2017
Espiga de milho ( <i>Zea mays</i> )	Ácido e enzimático	<i>Spathaspora passalidarum</i>	75	Yu <i>et al.</i> , 2017
Cascas de avelã ( <i>Corylus avellana</i> )	Alcalino e enzimático	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	96	Hoşgün <i>et al.</i> , 2017
Farelo de girassol ( <i>Helianthus annuus</i> L.)	Alcalino, ácido e enzimático	<i>Pichia stipitis</i>	45	Camargo <i>et al.</i> , 2014
Bagaço de caju ( <i>Anacardium occidentale</i> L.)	Alcalino, ácido e enzimático	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	80	Barros <i>et al.</i> , 2017
Palha de arroz ( <i>Oryza sativa</i> )	Ultrassom e enzimático	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	61	Sindhu <i>et al.</i> , 2016
Bagaço de cana ( <i>Saccharum officinarum</i> )	Ácido, explosão a vapor e enzimático	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91	Neves <i>et al.</i> , 2016
Resíduos da beterraba ( <i>Beta vulgaris</i> )	Ácido	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	49	Yucel & Aksu, 2015

Fonte: Próprio autor.

A quantidade de biomassas disponíveis que têm sido estudadas para produção de bioetanol lignocelulósico é relevante, e entre estas se destacam, a palha de arroz, a palha de trigo, a palha de milho e o bagaço de cana-de-açúcar. Essas biomassas apresentam composição química variada, todavia, possuem como componente principal a celulose (KIM & DALE, 2004; SARKAR *et al.*, 2012).

Embora os substratos convencionais sejam os mais utilizados na produção do bioetanol de segunda geração, algumas biomassas oriundas da cadeia de produção do biodiesel, também merecem destaque, por apresentar altos teores de celulose e hemicelulose (MACEDO *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2012). Dentre estas, por exemplo, encontra-se a cultura do girassol (*Helianthus annuus* L.), que, além de importante na elaboração de óleo comestível, vem ganhando grande relevância na produção do biodiesel (MACIEL *et al.*, 2012). A partir da produção mundial de sementes desta cultura, 90% são destinadas a produção de óleos e os 10% restantes, à alimentação de pássaros e consumo humano direto (ROSSI, 1998). Em se tratando da produção do biodiesel de girassol através da transesterificação de triglicerídeos são gerados ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e glicerina, bem como, coprodutos sólidos, denominados de torta e farelo (LANJEKAR & DESHMUKH, 2016).

No Brasil, milhões de toneladas de tortas e farelos oriundos do processamento de girassol pelas indústrias de biodiesel são produzidos anualmente (GENTIL; SERRA; CASTRO; 2012). Em média, na produção de uma tonelada do óleo de girassol, são necessárias 3,9 toneladas de sementes e para cada tonelada de grãos processados, são produzidos cerca de 350 Kg de torta de girassol (BORSUK, 2008; CAMARGO, 2012; PIMENTEL & PATZEK, 2005).

As tortas e farelos gerados na extração do óleo dessa oleaginosa são subutilizados e não passam por processos de agregação de valor, sendo empregada na adubação orgânica, alimentação animal ou ainda, na geração de energia por queima direta, o que leva a menores emissões de gases do efeito estufa a atmosfera (ABDALLA *et al.*, 2008; VISSER *et al.*, 2011). Desta forma, é evidente a relevância de se investigar o potencial desta biomassa lignocelulósica, para a produção de bioetanol, pois além de agregar valor a tais resíduos, torna a indústria do biodiesel de girassol mais competitiva (SANTOS, 2015). O uso da torta e/ou farelo de girassol na produção de etanol de segunda geração, poderá contribuir de forma significativa na minimização dos problemas ambientais decorrentes do seu descarte na natureza (VIIKARI; VEHMAANPERA; KOIVULA, 2012; VISSER, *et al.*, 2011).

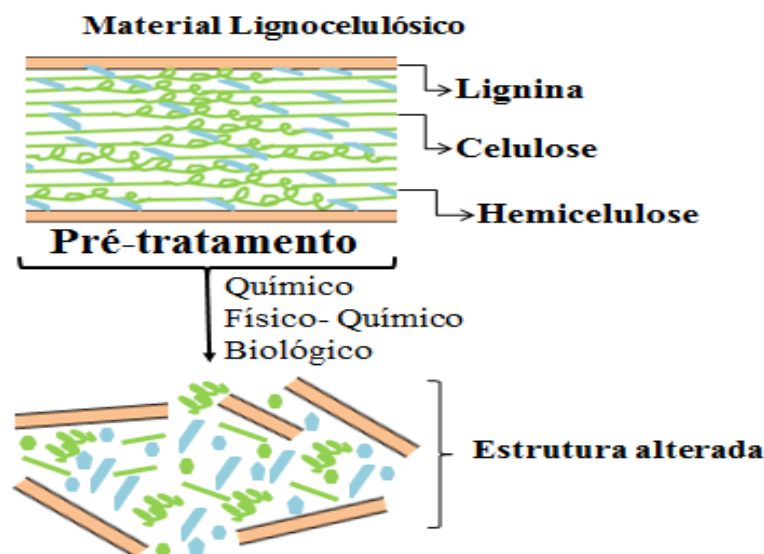


Entretanto, vale ressaltar que os estudos envolvendo o uso da fração hemicelulósica da torta de girassol para produção de etanol lignocelulósico ainda são incipientes, necessitando de maiores abordagens.

### 3.2 Pré-tratamentos e hidrólise de materiais lignocelulósicos

A aplicação dos pré-tratamentos em materiais lignocelulósicos desempenha um papel fundamental na conversão viável de bioetanol de segunda geração, visto que, a complexa estrutura desta biomassa torna o processo de produção do bioetanol complexo e meticuloso, além de influenciar de forma crítica nas fases subsequentes de sua produção (AGUILAR-REYNOSA *et al.*, 2017; UDEH & ERKURT, 2017). O pré-tratamento representa mais de 40% do custo total do processamento e é realizado a fim de disponibilizar a estrutura do material lignocelulósico através da remoção da matriz de lignina-hemicelulose e, conseqüentemente, aumentar a área de superfície para a hidrólise da holocelulose em açúcares fermentecíveis (FIG. 5) (NASEERUDDIN; DESAI; RAO, 2017; SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016). Todavia, a hidrólise é o método pelo qual as ligações glicosídicas dos substratos lignocelulósicos são clivadas, e é utilizado para facilitar a dissolução do produto químico pela reação com água, sendo eficaz em alguns compostos orgânicos que são relativamente resistentes à solubilização e degradação (JENSEN *et al.*, 2010).

**Figura 5** – Esquema dos pré-tratamentos na estrutura da biomassa lignocelulósica



**Fonte:** Modificado de MOSIER *et al.* (2005).

A hidrólise da biomassa lignocelulósica sem qualquer pré-tratamento pode render menos de 20% dos açúcares totais, enquanto que após o pré-tratamento, chega a atingir até 90% (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016). Portanto, esta etapa é essencial para haver uma eficiente hidrólise enzimática, pois às várias barreiras físicas e químicas inibem fortemente a acessibilidade do substrato às enzimas celulolíticas (PARK & KIM, 2012).

Os pré-tratamentos, para serem considerados eficientes para a produção do bioetanol, devem atender aos seguintes requisitos: melhorar o rendimento da sacarificação da celulose; não provocar a perda ou a degradação dos carboidratos; não promover a formação de subprodutos inibidores do processo fermentativos, bem como, apresentar um custo-benefício compensatório (KUMAR; SHARMA; SINGH, 2017).

Os métodos de pré-tratamento podem ser classificados de três formas: químicos, físicos e biológicos, sendo importante mencionar que a combinação destes pode ser necessária e mais eficiente em alguns casos a depender da biomassa empregada (AGUILAR-REYNOSA *et al.*, 2017; RABEMANOLONTSOA & SAKA, 2016), todavia, alguns envolvem custos operacionais dispendiosos, além de efeitos mais severos sob a fermentação. Na Tabela 2, estão demonstrados diferentes pré-tratamentos usados em materiais lignocelulósicos, bem como, suas vantagens e desvantagens de aplicação.

O pré-tratamento químico, empregando ácidos ou álcalis na reação de hidrólise da biomassa lignocelulósica é considerado como um dos métodos mais promissores para melhorar a biodegradabilidade da celulose, pois não ocasionam a remoção de lignina e /ou hemiceluloses e diminuem o grau de polimerização e cristalinidade da estrutura celulósica (AGBOR *et al.*, 2011; CAMARGO *et al.*, 2014).

O pré-tratamento ácido, em particular pelo uso de ácido sulfúrico, é o mais utilizado dos tratamentos químicos para a biomassa lignocelulósica. Neste tratamento os polissacarídeos (principalmente hemiceluloses) são hidrolisados a monossacarídeos, proporcionando uma maior acessibilidade da celulose à hidrólise enzimática (CAMARGO *et al.*, 2014; BEHERA *et al.*, 2014; MARTÍNEZ-PATÍÑO *et al.*, 2017). Os principais açúcares resultantes da hidrólise ácida da hemicelulose são a D-xilose (açúcar majoritário), L-arabinose, D-glicose, D-galactose e D-manose (MENON & RAO, 2012; KUHAD *et al.*, 2011).

**Tabela 2** – Efeito de diferentes pré-tratamentos usados em materiais lignocelulósicos.

Pré-tratamento		Características composicionais			Vantagens	Desvantagens
		Celulose	Hemicelulose	Lignina		
<b>Físico</b>	Moinho de bolas	Intensiva diminuição do grau de cristalinidade	Não remove	Não remove	Redução de Cristalinidade	Redução de cristalinidade
	Ácido diluído	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Condições médias, altas produção de xilose	Difícil recuperação do ácido, corrosivo e relativamente custoso
	Hidróxido de sódio	Inchação Significativa	Considerável solubilidade	Considerável solubilização, >50%	Remoção efetiva de Ésteres	Reagente caro, recuperação Alcalina
	Hidróxido de cálcio	Pouca despolimerização	Significativa solubilização	Solubilização parcial (~40%)	Efetiva remoção de lignina e acetil, baixo custo	Menor efetividade devido a pouca solubilidade da cal
<b>Químico</b>	Ozonólise	Não foi observada despolimerização	Pequena solubilização	Solubilização acima de 70%	Efetiva deslignificação em condições suaves	Caro, necessidade de mais Ozônio
	Organosolv	Considerável Inchação	Significativo, quase completa	Significativo, pode ser quase completa	Alta produção de xilose, efetiva deslignificação	Alta produção de xilose, efetiva deslignificação
<b>Biológico</b>	Biológico	20-30% de despolimerização	Acima de 80% de solubilização	~40% de Deslignificação	Baixo requerimento de energia, efetiva deslignificação	Perda de celulose, baixa taxa de hidrólise
<b>Combinado</b>	Explosão a vapor	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Energia eficiente, nenhum custo de reciclagem	Degradação da xilana como produto inibitório

**Fonte:** Citado por SANTOS (2012).

O pré-tratamento ácido pode ser realizado de duas formas: empregando baixa concentração de ácido com temperatura elevada ou ainda, aplicando uma maior concentração de ácido com temperatura mais branda. Os ácidos concentrados não são preferidos por serem corrosivos e para que se reduzam os custos, estes devem ser recuperados ao final do processo (SARITHA & ARORA, 2012; ZHENG; PAN; ZHANG, 2009). Os reagentes ácidos mais utilizados neste pré-tratamento são os: ácidos sulfúrico, clorídrico, fosfórico, fluorídrico e nítrico (RABEMANOLONTSOA & SAKA, 2016), entretanto, ácidos orgânicos, tais como, ácido oxálico, ácido acetilsalicílico e ácido salicílico, também podem ser empregados como catalisadores (BEHERA *et al.*, 2014).

O pré-tratamento alcalino, por sua vez, é um processo que tem por objetivo a deslignificação, entretanto, uma quantidade significativa de hemicelulose é solubilizada (ZHENG; PAN; ZHANG, 2009). Na ação do catalisador alcalino ocorre quimicamente um aumento do volume das fibras celulósicas, bem como reações de saponificação que levam à ruptura das ligações entre as hemiceluloses e os demais componentes, aumentando assim, a porosidade da biomassa (MOOD *et al.*, 2013). O hidróxido de sódio, o hidróxido de potássio, o hidróxido de cálcio e o amoníaco são os principais reagentes utilizados neste método, pois apesar de ser operado a temperaturas mais baixas e não necessitar de reatores complexos, o seu uso requer um tempo longo de ação (de horas para dias) o que torna dispendiosa a sua aplicação (WAN; ZHOU; LI, 2011).

O pré-tratamento físico, como moagem, fragmentação, congelamento e radiação, aumentam a área de superfície da biomassa e reduz o tamanho das partículas em materiais lignocelulósicos. Além disso, este tratamento conduz a uma diminuição do grau de polimerização e cristalinidade da celulose (HOŞGÜN *et al.*, 2017). A redução do tamanho das partículas da biomassa é utilizada na maioria dos estudos de pesquisa de hidrólise, mas pouca informação está disponível sobre as características do substrato e o consumo de energia no processo. Outro fato diz respeito a combinação de pré-tratamentos físicos com outros pré-tratamentos, a qual é normalmente utilizada (BEHERA *et al.*, 2014).

O pré-tratamento biológico ou microbiano, ao contrário dos métodos de pré-tratamentos químicos e físico-químicos, não necessita de requisitos químicos, e está associado principalmente à ação de fungos capazes de produzir enzimas para degradar principalmente, a lignina presente na biomassa (UDEH & ERKURT, 2017). Entretanto, apesar do baixo consumo de energia, condições ambientais favoráveis e nenhuma exigência química, o pré-tratamento biológico ainda enfrenta alguns inconvenientes, que afetam negativamente sua

aplicação, incluindo um tempo de processo longo, exigência de espaço grande e a necessidade de monitoramento contínuo do crescimento dos micro-organismos. Todavia, um dos maiores gargalos diz respeito ao fato de que a maioria dos micro-organismos lignolíticos utilizados no processo solubilizam/consomem não apenas a lignina, mas também a hemicelulose e a celulose (BEHERA *et al.*, 2014; UDEH & ERKURT, 2017) refletindo nos rendimentos de substrato do processo.

### 3.3 Subprodutos da hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos

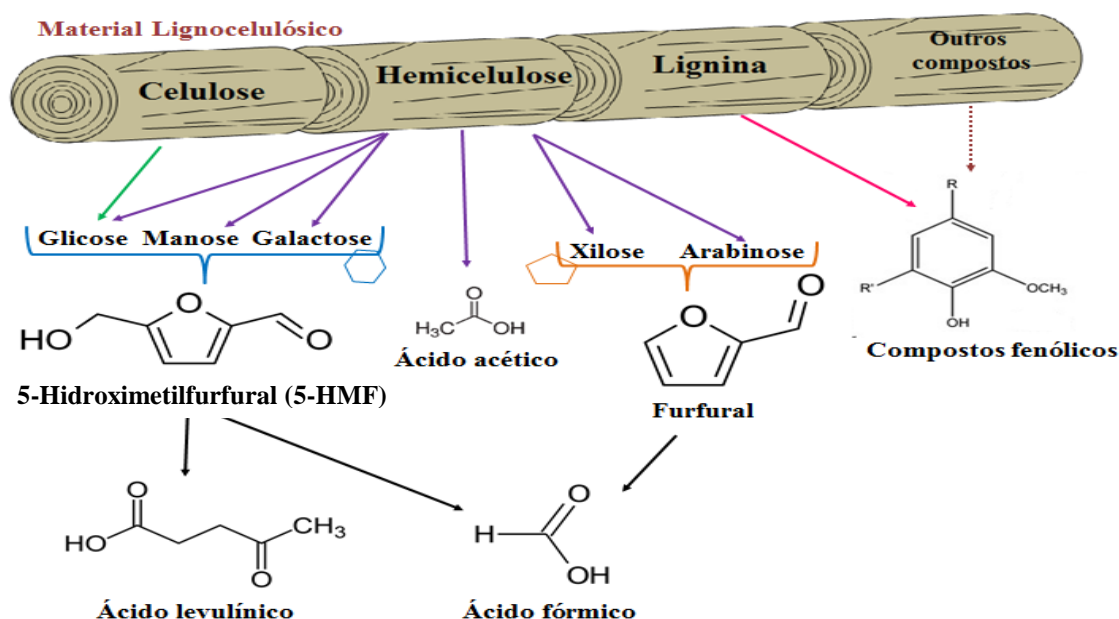
Os pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos são empregados com a finalidade de se conseguir uma boa digestibilidade enzimática da celulose e hemicelulose, entretanto, independente do método utilizado, alguns compostos inibitórios são produzidos durante este processo, os quais podem ter efeitos negativos sob as etapas subsequentes da produção de bioetanol (JONSSON & MARTIN, 2016; MOOD *et al.*, 2013).

Os compostos inibidores formados no pré-tratamento são fortemente dependente do tipo da matéria-prima utilizada, bem como, das condições empregadas no método. Dentre os produtos da fermentação que podem ser inibidos por estes compostos, tem-se o etanol e o butanol (DUNLOP, 2011).

Os inibidores podem ser classificados em três grupos principais: (1) ácidos fracos, tais como ácido acético, levulínico e fórmico; (2) derivados de furanos, sendo os principais o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) e o furfural, e (3) compostos fenólicos, como a vanilina, siringaldeído e ácido 4-hidroxibenzóico (FIG. 6) (JONSSON; ALRIKSSON; NIVEBRANT, 2013; PALMQVIST & HAHN-HAGERDAL, 2000).

Durante o pré-tratamento ácido na hemicelulose são formados os seguintes compostos: ácido acético a partir dos seus grupos acetilas e, furfural e 5-HMF, a partir da reação de desidratação das pentoses e hexoses, respectivamente (JONSSON & MARTIN, 2016). Em condições severas de pré-tratamento da biomassa, como tempo de reação prolongada, altas temperatura e concentração de ácido elevado, o 5-HMF pode ainda, ser degradado a ácidos levulínico e fórmico (CAPOLUPO & FARACO, 2016; FENGEL & WEGENER, 1983). Embora outros compostos inibitórios sejam liberados durante o pré-tratamento ácido, neste estudo foram analisados o efeito apenas de alguns inibidores gerados da fração hemicelulósica, como o ácido acético, o furfural e o 5-HMF.

**Figura 6** - Esquema geral dos principais inibidores gerados a partir do material lignocelulósico durante o pré-tratamento ácido.



**Fonte:** Adaptado de JONSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT (2013).

O ácido acético,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , considerado um dos inibidores primários da biomassa lignocelulósica, está presente em concentrações significativas na maioria dos hidrolisados (JONSSON; ALRIKSSON; NIVEBRANT, 2013). Sua ação inibitória pode afetar as taxas de crescimento das células microbianas, bem como a produção de etanol (WALTON; VAN HEININGEN; VAN WALSUM, 2010).

Os aldeídos de furano, furfural e 5-HMF, assim como o ácido acético, podem inibir o crescimento de leveduras e diminuir o rendimento e produtividade em etanol, entretanto, seus efeitos inibitórios na célula microbiana são mais adversos (RAN *et al.*, 2014). Esses compostos agredem a membrana celular e prejudicam o metabolismo intracelular, principalmente, por afetar enzimas da via glicolítica (BANERJEE; BHATNAGAR; VISWANATHAN, 1981; MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009; QUEMENEUR *et al.*, 2012). Em bioprocessos, alguns micro-organismos têm a capacidade de converter o furfural a álcool furfurílico e ácido furóico, e o 5-HMF a 5-hidroximetil e álcool furfurílico, sendo essas bioconversões provenientes de tentativas do micro-organismo em reduzir os efeitos adversos ocasionados por esses compostos a célula (VAN DER POL, 2014; WANG & YUAN, 2017).

### 3.4 Efeito dos compostos inibidores da fração hemicelulósica sobre a fermentação

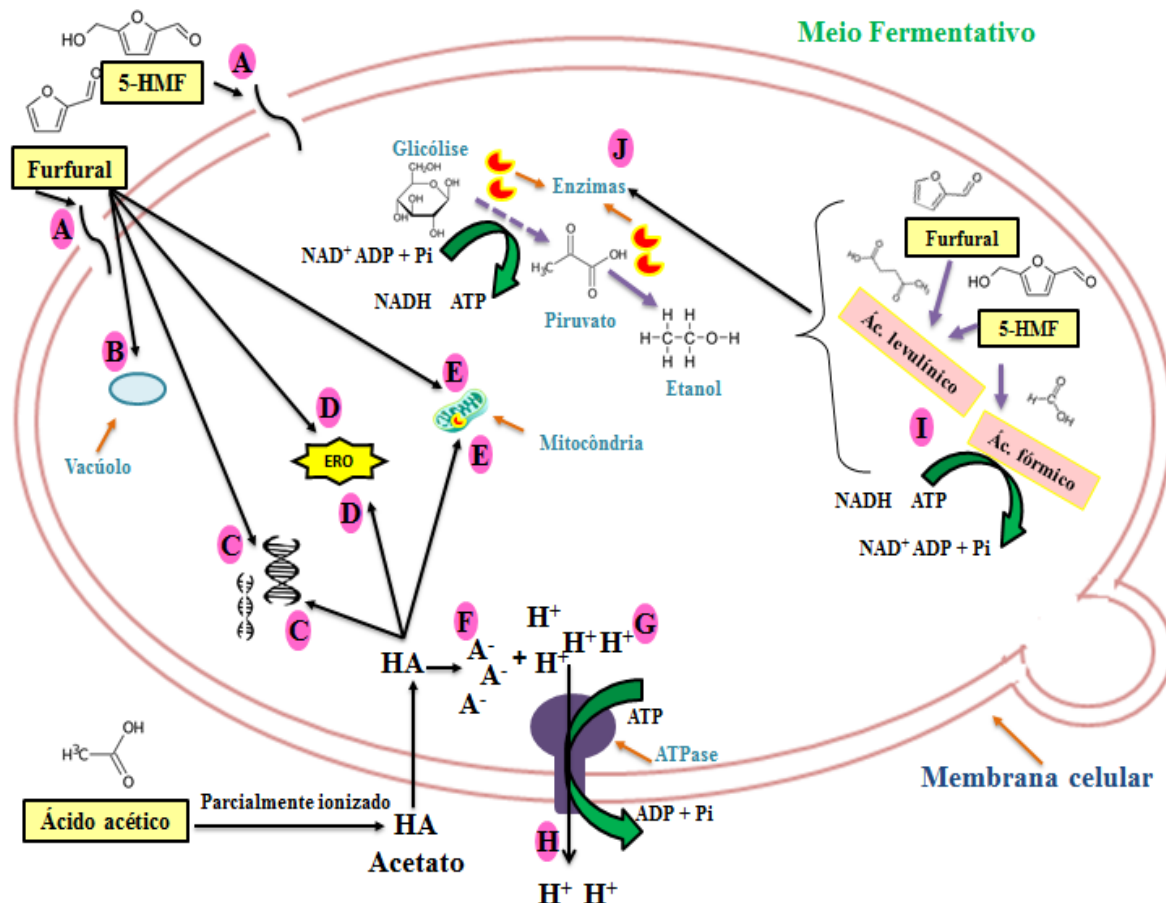
Considerando que os compostos formados durante a hidrólise do material hemicelulósico apresentam efeito citotóxicos para célula, o que consequentemente afeta o rendimento e produtividade do bioetanol. Os principais inibidores originados na degradação da fração hemicelulósica e seus principais efeitos sobre a célula microbiana são apresentados na Figura 7, com base no relato de alguns autores (IBRAHEEM & NDIMBA, 2013; JONSSON; ALRIKSSON; NIVEBRANT, 2013; MONLAU *et al.*, 2013; PAMPULHA & LOUREIRO-DIAS, 1989; PINTO *et al.*, 1989).

A forma não dissociada do ácido acético pode permear a membrana plasmática por difusão simples, e interferir no metabolismo celular, pois ocasiona alterações do pH intracelular, interrompendo a síntese de diversas proteínas e interferindo em outros processos celulares (CASAL; CARDOSO; LEÃO, 1998). Sendo assim, uma vez no interior da célula, onde o pH, geralmente encontra-se neutro, a forma não dissociada do ácido pode liberar seus prótons, promover a acidificação intracelular e a acúmulo de íons. O acúmulo de íons no citoplasma pode aumentar a pressão de turgência, e acarretar num aumento de volume da célula pela entrada de água, levando à lise celular. Desta forma, como mecanismo de sobrevivência, a célula bombeia o excesso de  $H^+$  para o meio extracelular por ação da ATPase as custas de ATP, o qual seria empregado no crescimento e em outras atividades celulares. Deste modo, com a persistência desse mecanismo a célula não disponibilizará de ATP para as suas funções vitais e consequentemente, não sobrevive (PAMPULHA & LOUREIRO-DIAS, 1989; PINTO *et al.*, 1989).

Ribeiro, Côrte-Real e Johansson (2006), estudando o efeito do ácido acético sobre o DNA de *S. cerevisiae*, observaram que altos níveis deste ácido pode promover a degradação do DNA em fragmentos de várias centenas de kilobases. Ainda, há evidências de que o processo de morte celular programada, induzido por ácido acético em células de *S. cerevisiae* é acompanhado por acúmulo de tipos reativos de oxigênio e diminuição da citocromo oxidase que afeta a respiração mitocondrial (GIANNATTASIO *et al.*, 2005; LUDOVICO *et al.*, 2002).

Estudos têm demonstrado que derivados de furanos, tais como o furfural e o 5-HMF podem diminuir o crescimento e a produtividade da célula, por afetar a glicólise pela inibição de enzimas desidrogenases, bem como, em alguns casos, alterar a ação das enzimas álcool, aldeído e piruvato desidrogenase (VAN DER POL, 2014).

**Figura 7-** Esquema dos principais inibidores originados da degradação da fração hemicelulósica e seus principais efeitos na célula



(A) Lise da membrana celular; (B) Danos à membrana do vacúolo; (C) Degradação da molécula de DNA; (D) Aumenta as espécies reativas de oxigênio (ERO); (E) Afeta a ação da citocromo oxidase interferindo na respiração mitocondrial; (F) Acúmulo de íons aumenta a pressão de turgência ocasionando a lise celular; (G) Aumento de H<sup>+</sup> - diminui pH intracelular afetando o metabolismo celular; (H) Exportação de H<sup>+</sup> pela ATPase a fim de controlar o pH intracelular, redução de ATP intracelular comprometendo o crescimento celular e vias dependentes de ATP; (I) A conversão em outros compostos reduzem o ATP intracelular; (J) Afetam enzimas da via glicolítica e da via de conversão do bioetanol. **Fonte:** Modificado de SIQUEIRA (2015).

O furfural também está ligado a um aumento dos tipos reativos de oxigênio, devido à constituição dipolar do seu grupo aldeído, causando danos às mitocôndrias, membranas de vacúolo, citoesqueleto e a cromatina nuclear (ALLEN *et al.*, 2010; FERON *et al.*, 1991). Os derivados de furano podem ser reduzidos a compostos menos inibidores, utilizando enzimas dependentes de NADH, que também atuam na via glicolítica, todavia, reduz a disponibilidade de ATP para a célula (JONSSON; ALRIKSSON; NIVEBRANT, 2013).



Apesar dos vários efeitos inibitórios ocasionados pelos metabólitos secundários, em alguns estudos (HERBERT; ELSWORTH; TELLING, 1956; TAHERZADEH; NIKLASSON; LIDÉN, 1997; PALMQVIST *et al.*, 1999), foi demonstrado que estes também podem gerar um efeito positivo nos rendimentos e na produtividade celular, visto que, alguns inibidores ocasionam a redução substancial do crescimento sem afetar a produtividade celular, resultando num maior rendimento de produto final (VAN DER POL, 2014).

De acordo com Afonso (2011), determinados micro-organismos são capazes de desenvolver mecanismos que lhes permitem sobreviver a condições de estresse. Os mecanismos são altamente complexos, e a tolerância é adquirida através de respostas moleculares rápidas, que protegem o micro-organismo contra danos causados pela exposição aos agentes estressantes. Essas respostas podem incluir mudanças na transcrição gênica, que em parte, podem estar relacionadas às respostas de desnaturação de proteínas, desordem das membranas, danos e alterações ao DNA, bem como, perturbações metabólicas na célula.

### 3.5 Leveduras fermentadoras de pentoses

Na produção do bioetanol lignocelulósico, as hexoses (glicose, galactose e manose) provenientes da biomassa são fermentadas a etanol por muitos micro-organismos que ocorrem naturalmente, entretanto, as pentoses, como xilose e arabinose, só podem ser fermentadas a etanol por relativamente poucas linhagens nativas e geralmente com baixos rendimentos (BERŁOWSKA *et al.*, 2016). Um micro-organismo para a produção de etanol a partir de pentoses presentes em hidrolisados deve apresentar os seguintes requisitos gerais: elevado rendimento em etanol, alta produtividade, ter uma boa tolerância contra inibidores, bem como, gerar altas concentrações de etanol e apresentar uma capacidade de fermentar em pH relativamente baixo (KUHAD *et al.*, 2011).

*Saccharomyces cerevisiae* é uma das leveduras mais usadas na fermentação do etanol usando glicose. No entanto, essa espécie não tem a capacidade de fermentar açúcares de cinco carbonos. As espécies de leveduras mais promissoras identificadas até o momento para a fermentação de pentoses são *Candida shehatae*, *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* e *Pachysolen tannophilus* (BIDEAUX *et al.*, 2016; FARIAS; ATALA; MAUGERI FILHO, 2017; HAHN-HAGERDAL *et al.*, 2007; KUHAD *et al.*, 2011). Outras espécies de leveduras também são relatadas como capazes de fermentar pentoses, como as dos gêneros *Brettanomyces*, *Clavispora*, *Schizosaccharomyces*, inúmeras espécies de *Candida* (*C. tenuis*,

*C. tropicalis*, *C. utilis*, *C. blankii*, *C. friedrichii*, *C. solani*, *C. intermedia* e *C. parapsilosis*) (GÁRDONYI *et al.*, 2003; HÄHN-HÄGERDAL *et al.*, 1994; NGUYEN *et al.*, 2006; RAO; BHADRA; SHIVAJI, 2008; RYABOVA; CHMIL; SIBIRNY, 2003; SKOOG & HÄHN-HÄGERDAL, 1988; STAMBUK *et al.*, 2003), bem como, alguns micro-organismos geneticamente modificados (KOBAYASHI *et al.*, 2017; LEE & JIN 2017; WIMALASENA *et al.*, 2014). As linhagens de leveduras *Galactomyces geotrichum* e *Candida akabanensis*, isoladas de materiais vegetais, demonstraram ser potenciais produtoras de etanol a partir da fermentação de pentoses em meio sintético (VALINHAS, 2016). Entretanto, ainda pouco se sabe sobre o metabolismo dessas linhagens na produção de bioetanol lignocelulósico.

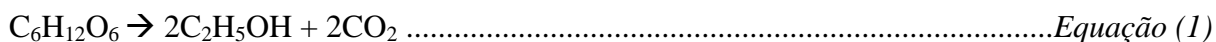
A espécie *G. geotrichum* possui ampla distribuição e é isolada de solos (FREGOLENTE *et al.*, 2009; SUPRAPTA; ARAI; IWAI, 1997), produtos lácteos (LESSARD *et al.*, 2014; MARCELLINO *et al.*, 2001), vegetais em decomposição (THORNTON; SLAUGHTER; DAVIS, 2010) e muitas outras fontes, tais como, leite de vaca, fezes humanas, vegetais e queijo (GENTE *et al.*, 2002). Enquanto que linhagens de *C. akabanensis*, têm sido isoladas de plantas, excremento de insetos (JAMES *et al.*, 2013) e fermentado de bebida alcoólica (SANTIAGO-URBINA *et al.*, 2016).

A linhagem *G. geotrichum* é classificada como o teleomorfo do *Geotrichum candidum*, ou seja, ambos tratam-se do mesmo fungo, pois dependendo da fase reprodutiva em que se encontra, assexual (anamorfo) ou sexual (teleomorfo), recebe nomes distintos (MALDONADO *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2007). A colônia do gênero *Galactomyces* apresenta características esbranquiçadas, farináceas ou filamentosas e com hifas verdadeiras (HOOG & SMITH, 2011), e estão comumente relacionados ao processo de produção de queijos, biodegradação de corantes e produção de lipase (MALDONADO *et al.*, 2017).

Estudos utilizando *C. akabanensis* em bioprocessos são escassos, sendo estas espécies associadas à mastite bovina (FRANCKIN, 2016) e à fermentação natural de Taberna (bebida alcóolica de palma) (SANTIAGO-URBINA *et al.*, 2016). A morfologia da colônia apresenta aspecto cremoso, de cor branco-amarelada, com superfícies e bordas lisas, e perfil achatado (VALINHAS, 2016).

Bioquimicamente, o emprego das linhagens *G. geotrichum* e *C. akabanensis*, bem como, de leveduras de uma forma geral, em reações de oxidação de carboidratos fermentescíveis, pode ser utilizada tanto para o crescimento celular (aumento de biomassa), quanto para a oxidação anaeróbia parcial, resultando na produção de etanol e dióxido de carbono (BREXÓ & SANT'ANA, 2017). A conversão de hexoses e pentoses a etanol ocorre

por vias metabólicas distintas e podem ser representadas de forma simplificada de acordo com as Equações 1 e 2, respectivamente, apresentadas abaixo:

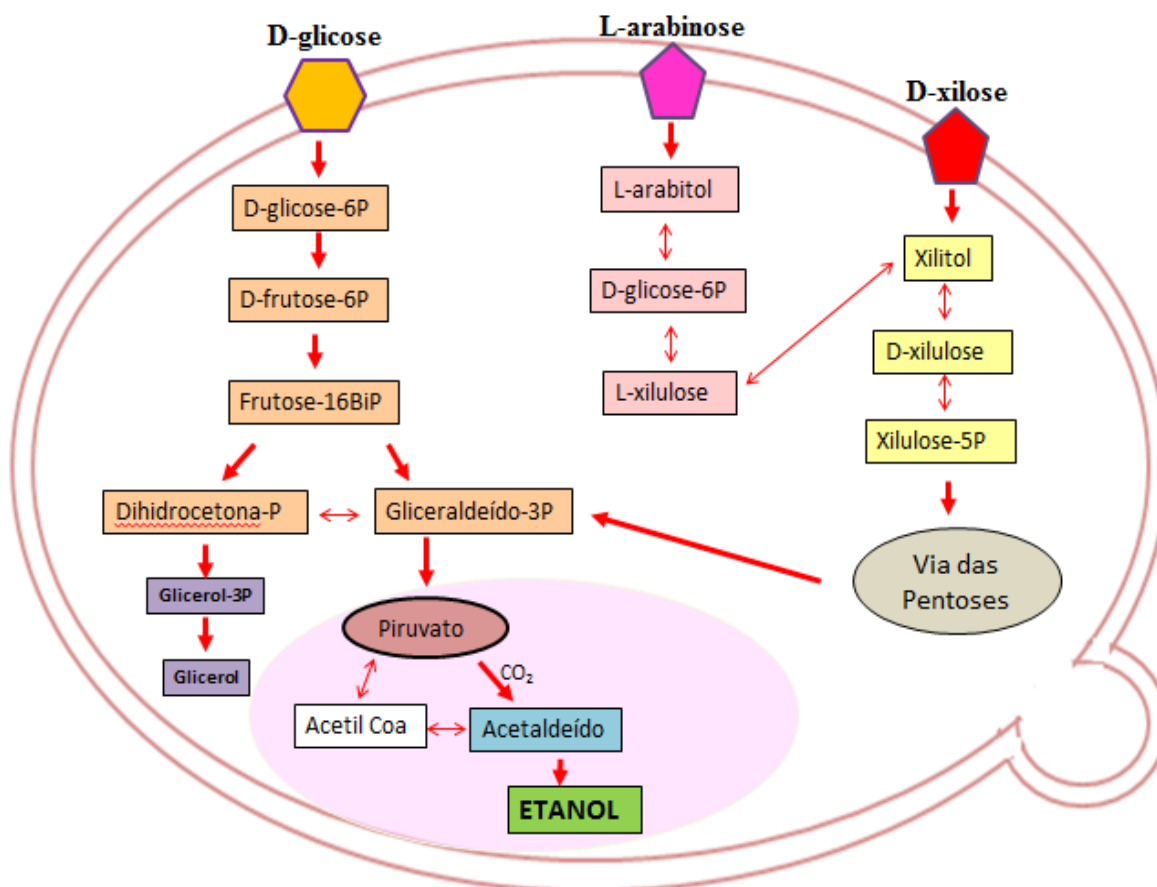


Na célula microbiana, as hexoses derivadas dos materiais lignocelulósicos entram na parte superior da glicólise através da fosforilação, dependente ou independente de transporte, seguida por isomerização no caso da D-manose e via de Leloir para D-galactose, resultado em moléculas de piruvato, com conjunta formação de ATP e NADH (JACKSON & NICOLSON, 2002). As pentoses geradas dessa fração, L-arabinose e D-xilose, estão intimamente relacionadas, compartilhando intermediários comuns, os quais podem ser convertidos por duas vias de assimilação, a via de óxido redução e a via isomerase, sendo a oxidorreductiva a mais conservada entre as leveduras (GÍRIO *et al.*, 2010).

A D-xilose, na via de óxido redução, é reduzida a xilitol pela enzima xilose redutase (XR) dependente de  $\text{NADPH}^+$ . Posteriormente, o xilitol é oxidado a D-xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH), que em seguida é fosforilado pela enzima xilulocinase (XK), formando outro intermediário, a D-xilulose-5-fosfato. Esse intermediário é metabolizado, e pode ser convertido a frutose-6-fosfato e/ou gliceraldeído-3-fosfato, que são intermediários comuns da via glicolítica, os quais a partir de reações enzimáticas, são convertidos a piruvato (FIG. 8) (GÍRIO *et al.*, 2010).

As leveduras, a fim de regenerar o  $\text{NAD}^+$  para restabelecer o potencial de oxirredução da célula, utilizam as moléculas de piruvato e NADH formadas na via glicolítica em reações de fermentação, podendo produzir o bioetanol (SARRIS & PAPANIKOLAOU, 2016; ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001). Na fermentação alcoólica o piruvato formado é convertido a etanol e  $\text{CO}_2$  em duas etapas: na primeira etapa o piruvato é inicialmente descarboxilado a acetaldeído pela enzima piruvato descarboxilase, em uma reação irreversível, tendo como cofatores o pirofosfato de tiamina e  $\text{Mg}^{2+}$ ; e na segunda etapa, o acetaldeído é reduzido a etanol por ação da enzima álcool desidrogenase, com poder de redução proporcionado por NADH, formando então, etanol e dióxido de carbono (FIG.8) (SARRIS & PAPANIKOLAOU, 2016).

**Figura 8** – Conversão dos monossacarídeos provenientes da fração hemicelulósica a etanol na célula leveduriforme



Fonte: Próprio autor.

Embora os micro-organismos desempenhem um papel fundamental na produção de bioetanol, as linhagens estudadas e os micro-organismos desenvolvidos por estudos de melhoramento genético, ainda não satisfazem todas as características de um micro-organismo ideal para a fermentação do etanol (NASEERUDDIN; DESAI; RAO, 2017). Neste contexto, considerando a vasta biodiversidade existente, a grande quantidade de espécies microbianas ainda não conhecidas e o pontencial de diversificação metabólica dos micro-organismos, o estudo de novas linhagens leveduriformes capazes de fermentar pentoses simultaneamente com a glicose (cofermentação de pentose e glicose), e com tolerância aos principais inibidores gerados da biomassa lignocelulósica, é relevante do ponto de vista científico e industrial (MARTINS, 2011; NOGUÉ & KARHUMAA, 2015). Considerando a escassez de estudos sobre o emprego das linhagens *G. geotrichum* e *C. akabanensis*, para produção de bioetanol, bem como, sua habilidade em fermentar pentoses frente às condições estressantes dos hidrolisados hemicelulósicos, este estudo avaliou a produção de bioetanol a partir de

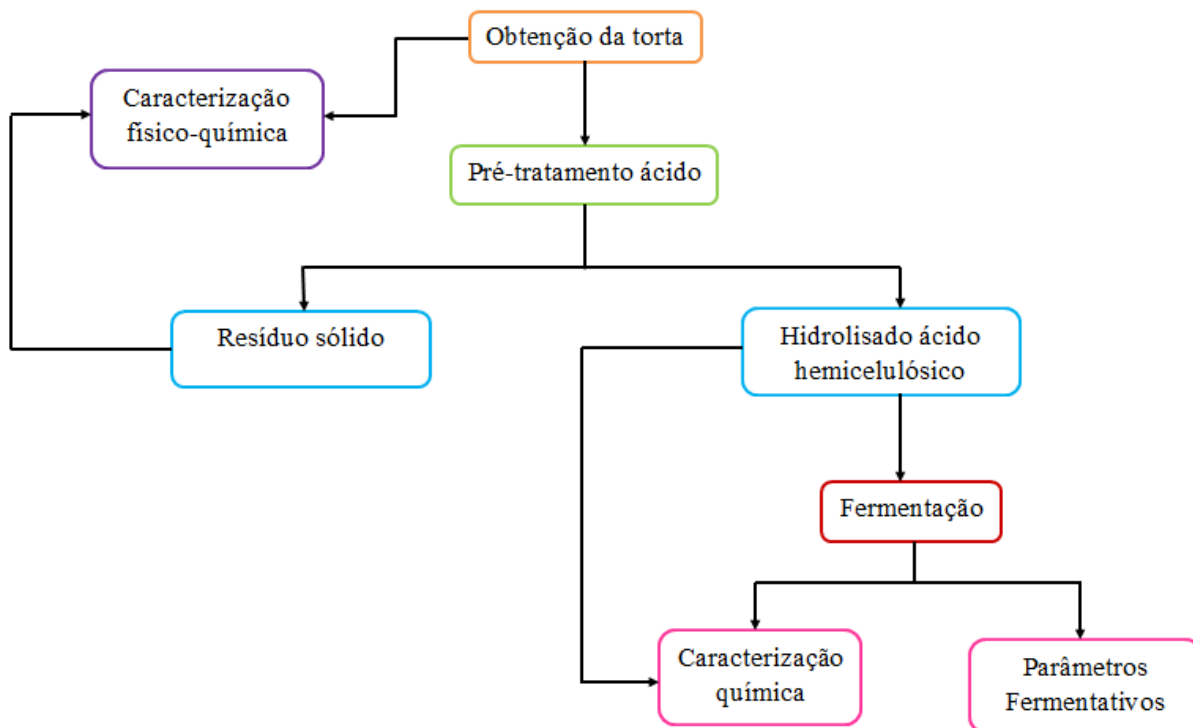
hidrolisado ácido hemicelulósico obtido da torta de girassol pelas linhagens *Galactomyces geotrichum* e *Candida akabanensis*.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas experimentais executadas no presente estudo foram realizadas nos seguintes laboratórios: Laboratório de Bioprocessos e Biotransformação (LabBio), Laboratório de Pré-tratamento e Caracterização de Biomassas Energéticas e Laboratório de Microbiologia para Biocombustíveis (LabMBio) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), localizado no *Campus JK*, Diamantina-MG. A Figura 9 apresenta de forma concisa as etapas experimentais desenvolvidas nesse trabalho.

**Figura 9** – Fluxograma das etapas metodológicas de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de torta de girassol empregando linhagens fermentadoras de pentoses.



Fonte: Próprio autor.

### 4.1 Obtenção e preparo da torta de girassol

A torta de girassol utilizada neste estudo foi obtida junto à empresa BIOSEP Complexo dos Lagos – Energia e Agronegócio Ltda, localizada no município de Três Pontas, MG. A torta foi submetida a três etapas: 1) submetida à secagem em estufa com circulação de ar forçada por 48 horas à temperatura de 60°C; 2) Após esta etapa, com intuito de reduzir e

padronizar o tamanho das partículas, a torta foi cominuída em moinho manual e submetida à secagem em estufa com circulação forçada de ar a 60°C por um período de 48 horas e a seguir, 3) o material obtido foi peneirado em malha de 1,0 mm e acondicionado em potes de plástico a temperatura ambiente (25±2°C) e reservada para estudos posteriores.

## 4.2 Caracterização físico-química da biomassa lignocelulósica (torta de girassol)

A caracterização físico-química da torta de girassol, antes e após o pré-tratamento, foi realizada por meio da determinação dos teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos totais (AOAC, 1992), fibra em detergente neutro – FDN, fibra em detergente ácido – FDA, celulose, lignina, hemicelulose (VAN SOEST, 1966; 1967), fibra bruta (VON DE KAMER & VAN GINKEL, 1952), amido (McCREADY *et al.*, 1950) e açúcares solúveis totais (DUBOIS *et al.*, 1956), sendo todas as análises feitas em triplicatas.

### 4.2.1 Umidade

O teor de umidade foi determinado a partir de 2,0 g de amostra contidos em cadinhos de porcelana, previamente desumidificada (105°C) e com massa conhecida. Os cadinhos contendo a amostra foram submetidos à desidratação em estufa a 105°C, até massa constante. O resultado foi calculado segundo a equação (Equação 3) abaixo e expresso em porcentagem de umidade.

$$U\% = \frac{(P_{mi} - P_{mf})}{P_{mi}} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

U% = teor de umidade (%)

$P_{mi}$  = massa do cadinho contendo a amostra úmida (g)

$P_{mf}$  = massa do cadinho contendo a amostra seca (g)

### 4.2.2 Cinzas

O teor de cinzas foi determinado a partir de 2,0 g de amostra contida em cadinho de porcelana, previamente calcinado em mufla a 550°C e com massa conhecida. As amostras foram previamente carbonizadas e em seguida incineradas em mufla a 550°C, por aproximadamente, 30 minutos. Após completa incineração, os cadinhos contendo as amostras



foram resfriados em dessecador e pesados. Os resultados foram expressos em g 100 g<sup>-1</sup> de matéria integral. A determinação foi feita segundo a equação abaixo (Equação 4).

$$C\% = \frac{(M-P)}{A} \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

C% = teor de cinzas (%)

M = massa do cadinho contendo as cinzas (g)

P = massa do cadinho vazio (g)

A = massa da amostra (g)

#### 4.2.3 Proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi realizada a partir de 2,0 mg de amostra peneirada em malha de 0,4 mm e submetidas a análise em analisador elementar Leco® CHNS/O, modelo TruSpec Micro. Os resultados foram expressos em porcentagem de matéria integral.

#### 4.2.4 Lipídeos totais ou Extrato etéreo

O teor de lipídeos foi quantificado a partir de 4,0 g de amostra contidas em cartuchos de papel de filtro (grau 292, 100 x 150 mm Sartorius®) qualitativo, com porosidade de 12,5 µm. Em seguida foram colocados em aparelho extrator Soxhlet, para extração dos lipídeos utilizando éter etílico P.A. como extrator, por aproximadamente 6 horas. Os lipídeos foram coletados em balões de fundo chato de 250 mL, previamente desumidificados a 105°C, resfriados em dessecador até temperatura ambiente e pesados. Após a extração, os balões foram mantidos em estufa a 105°C por aproximadamente uma hora para evaporação do solvente remanescente no óleo e em seguida, resfriados em dessecador até temperatura ambiente e pesados. Os resultados foram expressos em g 100g<sup>-1</sup> de amostra integral e determinado segundo a equação abaixo (Equação 5).

$$LIP\% = \frac{(M-P)}{A} \times 100 \quad \text{Equação (5)}$$

LIP% = teor de lipídeo (%)

M = massa do balão com lipídeo (g)

P = massa do balão vazio (g)

A = massa da amostra contida no cartucho de papel (g)

#### 4.2.5 Fibra em detergente neutro (FDN)

A quantificação da FDN foi realizada a partir da digestão de 0,25 g de amostra contidas em tubo de ensaio, juntamente com 25 mL de solução de detergente neutro, em bloco digestor por 30 minutos a 110°C. Em seguida, o material foi filtrado em filtros de vidro sinterizados, previamente desumidificados em estufa a 105°C e com peso conhecido. As amostras foram lavadas com água destilada quente (65 ±2°C) e posteriormente, com acetona para retirada total do detergente. Em seguida, os filtros de vidro sinterizados contendo a amostra foram secos em estufa a 105°C até peso constante. O teor de fibras solúveis em detergente neutro foi expresso em gramas de FDN 100 g<sup>-1</sup> de torta íntegra, calculados usando a seguinte equação (Equação 6):

$$FDN\% = \frac{(Fs - Fv)}{\text{Peso da amostra}} \times 100 \quad \text{Equação (6)}$$

FDN% = teor de fibra em detergente neutro (%)

Fs = massa do filtro de vidro sinterizado com resíduo depois de lavado e seco (g)

Fv = massa do filtro de vidro sinterizado vazio (g)

#### 4.2.6 Fibra em detergente ácido (FDA)

A quantificação do teor de FDA foi realizada a partir da digestão de 0,25 g de amostra contida em tubo de ensaio, juntamente com 25 mL de solução de detergente ácido em bloco digestor por 30 minutos a 110°C. Em seguida, o material foi filtrado em filtro de vidro sinterizado, previamente desumidificados em estufas a 105°C e com peso conhecido. As amostras foram lavadas com água destilada quente (65±2°C) e posteriormente, com acetona, para retirada total do detergente. Após a lavagem com acetona, os filtros de vidro sinterizado contendo as amostras foram secos em estufa a 105°C até peso constante. O teor de fibras solúveis em detergente ácido foi expresso em gramas de FDA 100 g<sup>-1</sup> de torta íntegra e calculado usando a seguinte equação (Equação 7):

$$FDA\% = \frac{(Flv - Fv)}{\text{Peso da amostra}} \times 100 \quad \text{Equação (7)}$$

FDA% = teor de fibra em detergente ácido (%)

Flv = massa do filtro com resíduo depois de lavado e seco (g)

Fv = massa do filtro vazio (g)

#### 4.2.7 Celulose

O teor de celulose foi determinado a partir dos filtros de vidro sinterizados proveniente da análise de FDA, com peso previamente conhecido. Os filtros foram adicionados de 30 mL de ácido sulfúrico 72% (p/p) e submetidos à agitação manual vigorosa. Em seguida, após o escoamento completo do ácido, os filtros foram lavados com água destilada quente ( $95 \pm 1^\circ\text{C}$ ), por três vezes consecutivas. Posteriormente, foram secos em estufa a  $105^\circ\text{C}$ , sendo resfriados em dessecador e pesados até peso constante. A massa de celulose foi dada pela diferença da massa do filtro de vidro sinterizado antes e depois da adição da solução de ácido sulfúrico a 72%. O resultado foi calculado de acordo com a fórmula descrita a seguir (Equação 8) e expresso em porcentagem de massa integral.

$$CEL\% = \frac{(Fi - Fd)}{\text{Peso da amostra}} \times 100 \quad \text{Equação (8)}$$

CEL% = teor de celulose (%)

Fi = massa do filtro sinterizado com resíduo depois de lavado e seco, antes da adição do ácido sulfúrico (g)

Fd = massa do filtro de vidro sinterizado com resíduo depois da adição do ácido sulfúrico (g)

#### 4.2.8 Lignina

A determinação do teor de lignina foi realizada a partir das amostras remanescentes da análise de celulose, as quais foram incineradas em mufla a  $550^\circ\text{C}$ . Após a completa incineração, os filtros foram resfriados em dessecador até temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). O teor de lignina foi calculado pela diferença entre a massa do filtro de vidro sinterizado antes da incineração e a massa do filtro de vidro sinterizado após incineração. Os resultados foram calculados de acordo com a equação (Equação 9) abaixo e expressos em porcentagem de massa integral:

$$LIG\% = \frac{(Fi - Fm)}{\text{Peso da amostra}} \times 100 \quad \text{Equação (9)}$$

LIG% = teor de lignina (%)

Fi = massa do filtro de vidro sinterizado contendo resíduo lavado e seco depois da adição do ácido sulfúrico (g)

Fm = massa do filtro de vidro sinterizado contendo resíduo depois de incinerados em mufla (g)

#### 4.2.9 Hemicelulose

O teor de hemicelulose foi determinado com base na diferença entre a massa da amostra remanescente da análise de FDN pela massa da amostra remanescente da análise de FDA. Os resultados foram calculados de acordo com a equação (Equação 10) abaixo e expresso em porcentagem de massa integral.

$$HEM\% = \frac{m(FDA) - m(FDN)}{\text{Peso da amostra}} \times 100 \quad \text{Equação (10)}$$

HEM% = teor de hemicelulose (%)

m(FDA) = massa da amostra remanescente da análise de FDA (g)

m(FDN) = massa da amostra remanescente da análise de FDN (g)

#### 4.2.10 Fibra bruta

O teor de fibra bruta foi realizado a partir da digestão de 1,0 g de amostra contida em tubo de ensaio, juntamente com 17,5 mL de ácido acético a 70% e 0,5 g de ácido tricloroacético em bloco digestor a 110°C por 1 hora. Posteriormente, o material foi filtrado em filtros de vidro sinterizados contendo lã de vidro, previamente desumificados e pesados. As amostras foram lavadas com água destilada quente (65±2°C) até retirada total da acidez. Os filtros de vidro sinterizados contendo amostra foram submetidos a secagem em estufa a 105°C até peso constante. Os resultados foram expressos em g 100g<sup>-1</sup> de fibra integral e o cálculo foi realizado de acordo com a equação abaixo (Equação 11):

$$FB\% = \frac{(C - F)}{\text{Peso da amostra}} \times 100 \quad \text{Equação (11)}$$

FB% = teor de fibra bruta (%)

C = massa do filtro de vidro sinterizado com resíduo de fibra após lavado e seco (g)

F = massa do filtro de vidro sinterizado vazio (g)

#### ***4.2.11 Amido e açúcares solúveis totais (AST)***

Os teores de amido e açúcares solúveis totais foram determinados segundo a metodologia descrita por McCready (1950), conforme descrito a seguir.

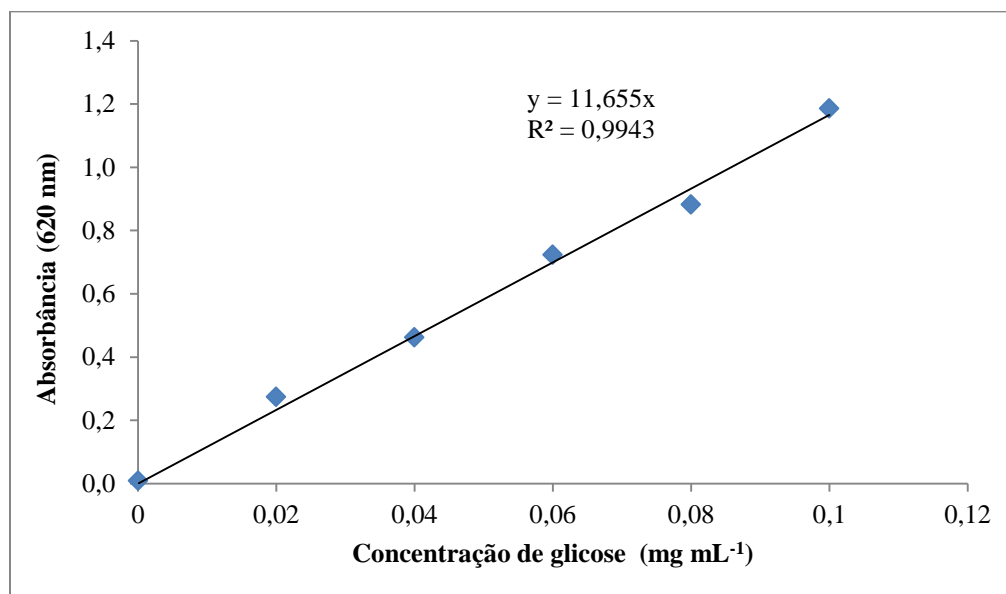
##### ***4.2.11.1 Preparo da amostra***

A amostra foi preparada a partir da adição de 0,2 g da torta, juntamente com 1,5 mL de álcool a 80% em microtubo tipo Eppendorf® de 2 mL, seguida de incubação em banho de água fervente ( $90\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por 15 minutos. Logo após procedeu-se a centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi recuperado e armazenado em balão volumétrico, sendo o processo repetido por três vezes. Após recuperação do sobrenadante, este foi avulamado com água destilada para 10 mL em balão volumétrico, para posterior quantificação de açúcares solúveis totais (AST). A partir do precipitado residual, foi realizada a extração do amido, para tanto, foram adicionados 1,5 mL de ácido perclórico 30%, seguido de agitação em agitador tipo vórtex por dois minutos. Em seguida, a reação foi deixada em repouso por 30 minutos, com agitação ocasional e então, centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos. O procedimento foi repetido por três vezes e o sobrenadante foi recuperado e avolumado para 10 mL em balão volumétrico para posterior quantificação de amido.

##### ***4.2.11.2 Quantificação do teor de amido e açúcares solúveis totais (AST)***

A quantificação dos teores de amido e AST foram realizadas com solução de antrona 0,1% em ácido sulfúrico concentrado, utilizando curva analítica de D-glicose como referência, nas concentrações de 0 a 0,5 mg mL<sup>-1</sup> (FIG. 10). A partir de cada amostra foi coletado 1 mL, seguido da adição de 5 mL da solução de antrona, em tubos de ensaio. Logo após a mistura foi incubada em banho de água fervente ( $95\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) por 12 minutos e em seguida resfriada em banho de água com gelo. A leitura da absorbância foi realizada a 620nm em espectrofotômetro Bel Photonics 1105®.

**Figura 10** - Curva analítica de glicose utilizada para dosagem de açúcares solúveis totais (AST) e Amido



Fonte: Próprio autor

#### 4.3 Obtenção da fração hemicelulósica da torta de girassol por hidrólise química

A hidrólise química da torta de girassol foi realizada de acordo com as condições pré-estabelecidas em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Bioprocesso e Biotransformação da UFVJM (trabalho não publicado), empregando uma solução de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) na concentração de 6% (v/v), com razão sólido-líquido (S/L) de 31%. O ensaio foi levado à autoclave vertical sob temperatura de 120°C, 1 atm, por 38 minutos seguido de filtração a vácuo em papel de filtro (grau 292, 100 x 150 mm Sartorius®). O hidrolisado hemicelulósico obtido foi aferido quanto ao pH e neutralizado com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  P.A. O resíduo sólido remanescente deste processo foi lavado com 100 mL de água destilada e o líquido recolhido, teve o pH neutralizado com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . O resíduo sólido após as sucessivas lavagens com água e filtração a vácuo em papel de filtro (grau 292, 100 x 150 mm Sartorius®) foi submetido à secagem em estufa com circulação de ar forçada a 65°C por 24 horas e reservado para posterior caracterização físico-química.

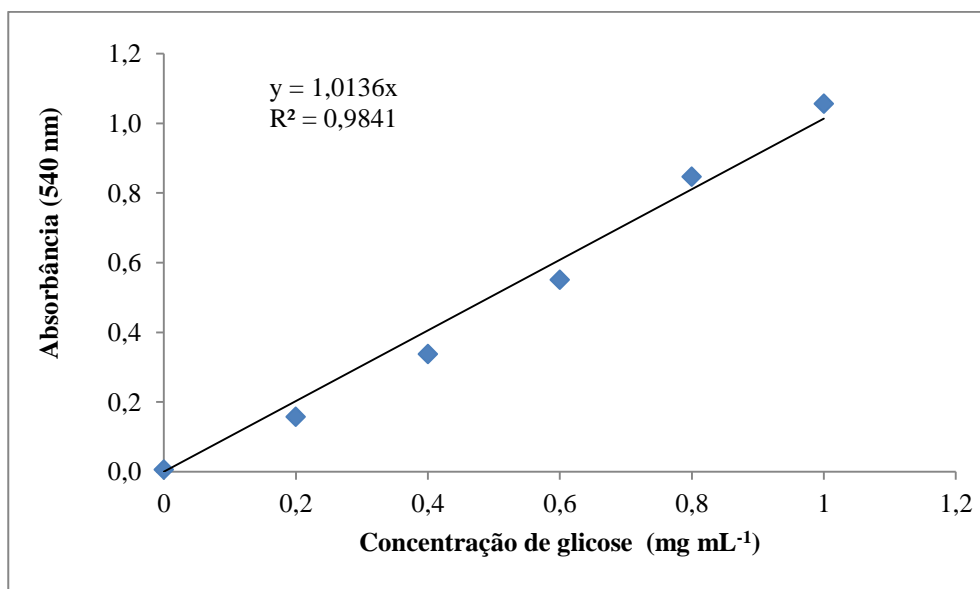
A fração hemicelulósica obtida logo após o pré-tratamento da torta de girassol e aquela resultante da lavagem do resíduo sólido, a fim de obter maior volume de hidrolisado, foram misturadas e homogeneizadas para posterior condução do processo fermentativo. Esta

fração foi analisada quanto ao teor de açúcares redutores (MILLER, 1959), L-arabinose, D-xilose, D-glicose, ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural e glicerol.

#### 4.3.1 Concentrações de açúcares redutores (AR)

Os açúcares redutores foram quantificados de acordo com o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico, descrito por Miller (1959). O teor de AR foi determinado a partir de 100  $\mu\text{L}$  do hidrolisado (centrifugado e devidamente diluído em água destilada) contidos em microtubos tipo *Eppendorf*® de 2 mL, seguidos da adição de 100  $\mu\text{L}$  do reagente de DNS (ácido dinitrosalisílico), homogeneização e incubação em banho de água fervente ( $95\pm 1^\circ\text{C}$ ) por um período de 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 1,0 mL de água destilada, e após homogeneização procedeu-se a leitura da intensidade de cor formada pelo método colorimétrico em espectrofotômetro a 540 nm. Uma curva analítica, utilizando glicose a 1 g L<sup>-1</sup> como padrão, foi preparada a fim de se obter a regressão linear para o cálculo da concentração de açúcares redutores presentes nas amostras (FIG. 11). Os teores de açúcares redutores foram expressos em g L<sup>-1</sup>.

**Figura 11** - Curva analítica de glicose utilizada para dosagem de açúcares redutores (AR).



Fonte: Próprio autor.

#### 4.3.2 Análise química do hidrolisado ácido hemicelulósico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As concentrações de L-arabinose, D-xilose, D-glicose, ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) e glicerol foram determinados através de cromatografia líquida com uso do sistema Shimadzu Prominence FPLC 20A, equipado com coluna Rezex ROA-Shodex® (300 x 7.5 mm) mantida a 60°C, usando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,0025 mol L<sup>-1</sup> como eluente a uma vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup>. A detecção por índice de refração (40°C) foi usada para a determinação dos açúcares, glicerol e ácido acético. O 5-HMF e furfural foram detectados por UV (254 nm). O volume de amostra injetado no cromatografo foi de 5 µL.

#### 4.4 Preparo do inóculo das linhagens fermentadoras de pentoses

As linhagens leveduriformes *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 e *Candida akabanensis* UFVJM-R131 foram provenientes do banco de linhagens microbianas do Laboratório de Bioprocessos e Biotransformação – UFVJM. As linhagens mantidas congeladas em glicerol a 10% foram reativadas em meio YMPD (*Yeast malt powered dextrose*) composto por 0,3% de extrato de levedura, 0,3% de extrato de malte, 0,5% de peptona, 1% de glicose e 1,5% de ágar p/v. As culturas foram incubadas à 28°C em BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) por 48 horas.

O inóculo foi preparado a partir de uma alçada das culturas em 100 mL do meio descrito por Toquero e Bolado (2014), formulado com 10 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 20,0 g L<sup>-1</sup> de peptona, 35,0 g L<sup>-1</sup> de D-glicose, 20,0 g L<sup>-1</sup> de D-xilose, 0,47 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 12,8 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,51 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,47 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. As culturas foram preparadas em frascos cônicos de 250 mL e incubadas a 28°C sob agitação de 150 rpm por período suficiente para atingir 1 unidade de densidade óptica (D.O), com leitura espectrofotométrica a 600 nm. Após o período de crescimento o meio foi centrifugado por 15 min a 4000 rpm e o sobrenadante descartado. O precipitado de células foi lavado 3 vezes com água destilada, a fim de retirar o resíduo do meio de cultivo e em seguida foi usado como inóculo na concentração de 10% v/v, nos meios de fermentação utilizados.

As medidas de D.O foram avaliadas por espectrofotometria com leitura de absorbância a 600 nm. As análises foram feitas a partir de 1 mL do meio de fermentação, seguido de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. Em seguida as células foram lavadas e



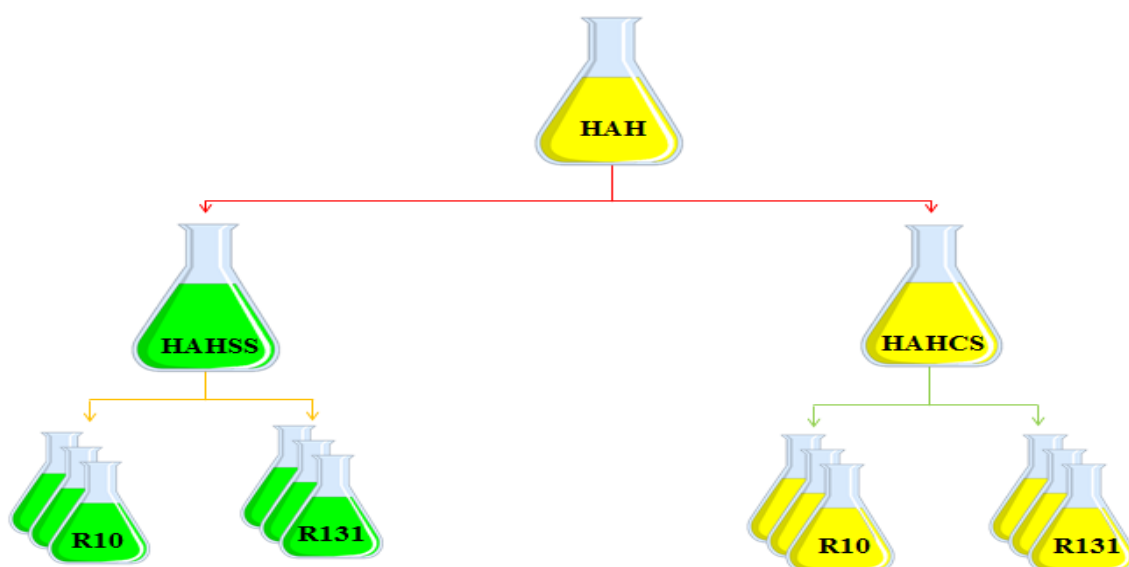
ressuspensas em água destilada, o sobrenadante descartado e o *pellet* celular recuperado, novamente ressuspensão em água destilada e então, submetido à leitura (600nm).

#### 4.5 Processo fermentativo da fração hemicelulósica da torta de girassol

O ensaio fermentativo utilizando a fração hemicelulósica da torta de girassol pré-tratada quimicamente, foi preparado em frascos cônicos de 50 mL, sendo conduzido sob duas condições, com e sem suplementação, conforme esquematizado na Figura 12. O preparo do meio suplementado foi feito na proporção 1:1 (hidrolisado hemicelulósico: suplemento). A suplementação foi realizada utilizando o mesmo meio de cultivo empregado no preparo do inóculo, excetuando-se as fontes de carbono. O ensaio sem suplementação foi realizado utilizando o hidrolisado puro. O inóculo foi realizado como descrito no item 4.4, a 1 unidade de D.O<sub>600nm</sub> na proporção de 10% v/v.

Os ensaios fermentativos foram realizados em triplicata, incubados a 28°C sob agitação de 150 rpm por 92 horas e monitorados a cada 4 horas quanto à concentração de células, açúcares (L-arabinose, D-xilose e D-glicose), álcoois (xilitol, glicerol e etanol), e inibidores do processo fermentativo (ácido acético, furfural e 5-HMF).

**Figura 12** – Representação esquemática da obtenção dos ensaios fermentativos sem suplementação (Hidrolisado) e com suplementação de sais, utilizando as linhagens *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 e *Candida akabanensis* UFVJM-R131.



HAH= Hidrolisado ácido hemicelulósico; HAHSS= Hidrolisado ácido hemicelulósico sem suplementação; HAHCS= Hidrolisado ácido hemicelulósico com suplementação; R10= *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10; R131= *Candida akabanensis* UFVJM-R131.

*akabanensis* UFVJM-R131. Suplemento de sais: 10 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 20,0 g L<sup>-1</sup> de peptona, 0,47 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 12,8 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,51 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,47 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O). **Fonte:** Próprio autor

A concentração de células foi determinada por leitura de D.O<sub>600nm</sub> em espectrofotômetro. Aliquotas de 100 uL do meio de fermentação diluída 10 vezes, foram coletadas e centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos para separação das células. O sobrenadante foi armazenado a -20°C para posteriores quantificações dos teores de açúcares, álcoois e inibidores do processo fermentativo, por análises cromatográficas. Os processos fermentativos foram avaliados ainda, quanto aos parâmetros de rendimento em etanol,  $Y_{P/S}$  (g<sub>etanol</sub> g<sub>açúcar</sub><sup>-1</sup>); produtividade volumétrica de etanol,  $Q_p$  (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) e eficiência fermentativa,  $E_f$  (%) (HISS, 2013).

#### 4.5.1. Fator de rendimento de produção de etanol ( $Y_{P/S}$ )

O fator de rendimento em etanol foi calculado pela relação entre o valor de etanol produzido em gramas e os açúcares totais consumidos em gramas. Os resultados foram expressos em g<sub>produto</sub> g<sub>substrato</sub><sup>-1</sup>. O cálculo foi baseado na seguinte equação (Equação 12).

$$Y_{\frac{P}{S}} = \frac{P}{S_i - S_f} \quad \text{Equação (12)}$$

$Y_{\frac{P}{S}}$  = Rendimento em etanol (g g<sup>-1</sup>)

$P$  = concentração final de etanol (g L<sup>-1</sup>)

$S_i$  = concentração inicial de açúcar presente no meio (g L<sup>-1</sup>)

$S_f$  = concentração final de açúcar presente no meio (g L<sup>-1</sup>)

#### 4.5.2 Produtividade volumétrica de etanol ( $Q_p$ )

A produtividade volumétrica de etanol foi expressa com base na quantidade de etanol produzido (g L<sup>-1</sup>) por tempo de fermentação (h) e, calculada de acordo com a equação (Equação 13) a seguir:

$$Qp = \frac{P}{t} \dots\dots\dots \text{Equação (13)}$$

Qp= Produtividade volumétrica (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)

P = concentração final de etanol (g L<sup>-1</sup>)

t = tempo de fermentação (h)

#### 4.5.3 Eficiência Fermentativa (Ef)

A eficiência fermentativa, expressa em %, representa a razão entre o fator de rendimento (Y<sub>p</sub> s<sup>-1</sup>) obtido experimentalmente e o fator de rendimento teórico (Y<sub>t</sub>) de 0,511 g g<sup>-1</sup> de glicose e/ou xilose consumida. Os valores foram obtidos por meio da equação (Equação 14) a seguir:

$$Ef \% = \frac{y_s^P}{0,511} \times 100 \dots\dots\dots \text{Equação (14)}$$

Ef: eficiência fermentativa (%)

y<sub>s</sub><sup>P</sup>: rendimento em etanol (g g<sup>-1</sup>)

#### 4.6 Análises estatística

Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) empregando teste de Tukey a 5% de significância. Este teste foi realizado para verificar se há diferença significativa entre as médias das analisadas nos experimentos. As análises foram conduzidas utilizando o software ASSISTAT Versão 7.7 - 2017.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises da composição físico-química da torta de girassol, que demonstram informações relevantes a respeito da qualidade da biomassa estudada na produção de bioetanol, estão apresentados na Tabela 3. Dentre os componentes analisados, merecem destaque a celulose, a hemicelulose e a lignina, os quais serão discutidos com maior ênfase devido as suas relações e influências diretas com o processo em estudo.

**Tabela 3** - Composição físico-química da torta de girassol (*Helianthus annuus* L.)

Frações	Torta de girassol (%)
Umidade	5,80±0,23
Lipídeos	44,41±0,03
Cinzas	2,78±0,03
Fibra Bruta	19,72±1,11
Proteínas Totais	15,62±1,90
AST	3,48±0,08
Amido	10,47±0,96
FDA	17,32±1,15
FDN	42,89±1,48
Celulose	13,03±0,53
Hemicelulose	26,03±2,28
Lignina	4,09±0,69

AST: Açúcares solúveis totais; FDA: Fibra solúvel em detergente ácido; FDN: Fibra solúvel em detergente neutro.

A torta de girassol analisada nesse estudo apresentou um teor de hemicelulose de 26,03%, que juntamente com a fração de celulose (13,03%), amido (10,47%) e AST (3,48%) perfazem um total de 53,03% de carboidratos (TAB. 3). Esse valor revela o potencial dessa biomassa residual para a produção do bioetanol.

O teor de holocelulose (soma de celulose + hemicelulose) determinado na torta de girassol foi de 39,06% (TAB. 3). De acordo com a literatura tais valores podem variar consideravelmente (18-60%), a depender do tipo de biomassa escolhida (CAMARGO *et al.*, 2014; CASTRO; DOS REIS CASTILHO; FREIRE, 2016; FERNÁNDEZ-CEGRÍ *et al.*, 2012). A explicação para este fato está relacionada à variação da composição química da cultura, as quais são influenciadas por vários fatores, tais como, tempo de maturação dos

frutos/sementes, fatores edafoclimáticos, composição do solo, fase de colheita, forma de extração do óleo, entre outros (DE PAULA & FATURI, 2008).

Os valores de lignina obtidos (4,09%) para a torta de girassol podem ser considerados baixos quando correlacionados aos valores relatados para outras biomassas lignocelulósicas, tais como: torta de pinhão-mansão com um teor de 33,3% (Santos *et al.* 2015); torta de dendê com 36,0% (Brito *et al.*, 2017); bagaço de cana-de-açúcar com 20,7% (Machado e Ferraz, 2017) e palha de girassol com 22,3% (Antonopoulou *et al.*, 2015). Todavia, este fato é vantajoso, pois essa macromolécula tem a função de aumentar a resistência da estrutura lignocelulósica a ataques químicos e enzimáticos, dificultando a liberação dos açúcares passíveis de fermentação (HIGUCHI, 1982; SANNIGRAHI *et al.*, 2011). A presença da lignina é ainda, capaz de comprometer o processo fermentativo do ponto de vista da formação de compostos tóxicos, pois durante sua hidrólise há liberação de alguns inibidores, como os compostos fenólicos (4-hidroxibenzoico, vanilina, catecol e siringaldeído), que afetam negativamente o metabolismo dos micro-organismos, acarretando perda da integridade celular, bem como redução das atividades de enzimas essenciais ao processo fermentativo, como a álcool desidrogenase, a aldeído desidrogenase e a piruvato desidrogenase (FOSSO-KANKEU; MARX; MEYER, 2015; HEIPIEPER *et al.*, 1994; MODIG *et al.*, 2002).

A obtenção de maiores rendimentos em bioetanol está atrelada à qualidade da composição química da biomassa empregada, bem como, aos efeitos dos pré-tratamentos utilizados na biomassa. Os pré-tratamentos podem influenciar de forma satisfatória na quantidade de substratos disponíveis para fermentação, todavia, podem afetar negativamente o processo por disponibilizar compostos químicos indesejáveis (LANCEFIELD *et al.*, 2017; SINGH; MAHANTA; BORA, 2017). Neste sentido os resultados referentes à caracterização química após o pré-tratamento por ácido diluído contribuíram de forma positiva para o melhor entendimento do processo de hidrólise e fermentação da torta de girassol em estudo.

Os resultados da caracterização química (celulose, hemicelulose e lignina) da torta de girassol, antes e após o pré-tratamento químico por ácido diluído, estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** - Composição química da torta de girassol antes e após o pré-tratamento químico com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 6%.

Frações	Biomassa	
	Antes do pré-tratamento ácido (%)	Após o pré-tratamento ácido (%)
Celulose	13,03±0,53 <sup>a</sup>	33,34±1,07 <sup>b</sup>
Hemicelulose	26,03±2,28	ND
Lignina	4,09±0,69 <sup>a</sup>	11,54±1,52 <sup>b</sup>

Valores na mesma linha (médias ± erro-padrão) seguida pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a  $p=0,05$ . ND: Não detectado.

O pré-tratamento químico, por ácido  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 6%, empregado para a hidrólise da torta de girassol foi eficiente, pois foi possível observar que a fração hemicelulósica mostrou-se sensível a esse tratamento. Tal fato pode ser verificado por meio dos resultados dos teores de hemicelulose antes e após o pré-tratamento (TAB. 4). Segundo Hendriks e Zeeman (2009), o uso do ácido sulfúrico diluído no processo de hidrólise induz mais facilmente à remoção da hemicelulose quando comparada à celulose, isso ocorre devido à menor massa molecular e cadeias laterais de açúcares mais curtas da hemicelulose, o que a torna mais facilmente hidrolisável. O pré-tratamento da lignocelulose com ácido diluído também proporciona a recuperação de um hidrolisado rico em pentoses, principalmente D-xilose (GOTO & KAMIYA, 2016). Esse aspecto foi reproduzido com o tratamento ácido da torta de girassol que resultou em hidrolisado contendo  $38 \text{ g L}^{-1}$  de açúcares redutores, mais da metade deles constituído pela xilose (TAB. 5).

**Tabela 5** - Composição química do hidrolisado ácido hemicelulósico proveniente da torta de girassol após o pré-tratamento químico com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 6%.

Componentes	( $\text{g L}^{-1}$ )
D-Glicose	7,57±0,25
D-Xilose	19,53±0,01
L-Arabinose	8,85±0,63
Açúcares redutores	37,77±1,46
Glicerol	7,63±0,00
5-hidroximetilfurfural	0,71±0,06
Furfural	0,05±0,00
Ácido acético	5,27±0,01

No pré-tratamento ácido, geralmente ocorre uma deslignificação imperceptível, podendo gerar um teor de lignina maior ou igual ao material de partida (SAMUEL; RAMAN;

RAGAUSKAS, 2010; CAO *et al.*, 2012). Neste sentido, os dados obtidos corroboram com a literatura, pois os teores de lignina na biomassa após a hidrólise foram superiores (11,54%) ao valor inicial encontrado (4,09%) em 2,82 vezes. Fernández-Cegri *et al.* (2012) estudando a concentração de lignina em torta de girassol após hidrólise ácida com  $H_2SO_4$  sob diferentes temperaturas, observaram aumento nos valores de lignina de 3% à 19%. Relatos na literatura demonstram que isso ocorre porque cada tipo de reagente tem ação diferenciada sobre diferentes partes do substrato, removendo aqueles que têm uma interação química maior pelo reagente. Os ácidos, normalmente, possibilitam a hidrólise da hemicelulose, enquanto que, reagentes alcalinos hidrolisam as ligações entre monômeros de lignina ou entre lignina e polissacarídeos, resultando em concentrações diferenciadas desses compostos na biomassa pré-tratada (BHUTTO *et al.*, 2017; KUMAR & SHARMA, 2017). As taxas relativamente mais elevadas em biomassas pré-tratadas podem ainda, ser atribuídas à perda concomitante de polissacarídeos, que ao serem removidos pelo reagente utilizado, promove o aumento da concentração da fração que fica retida no resíduo sólido remanescente.

Embora o principal objetivo do pré-tratamento ácido de biomassas lignocelulósicas seja a remoção da hemicelulose para favorecimento da sacarificação enzimática da celulose, o pré-tratamento envolve frequentemente reações secundárias, que resultam em subprodutos derivados da hidrólise de grupos acetila presentes na hemicelulose e da desidratação de monossacarídeos, gerando o ácido acético, o furfural e o 5-hidroximetilfurfural, entre outros. Todos esses subprodutos podem levar à inibição de processos bioquímicos a jusante (JONSSON & MARTÍN, 2016).

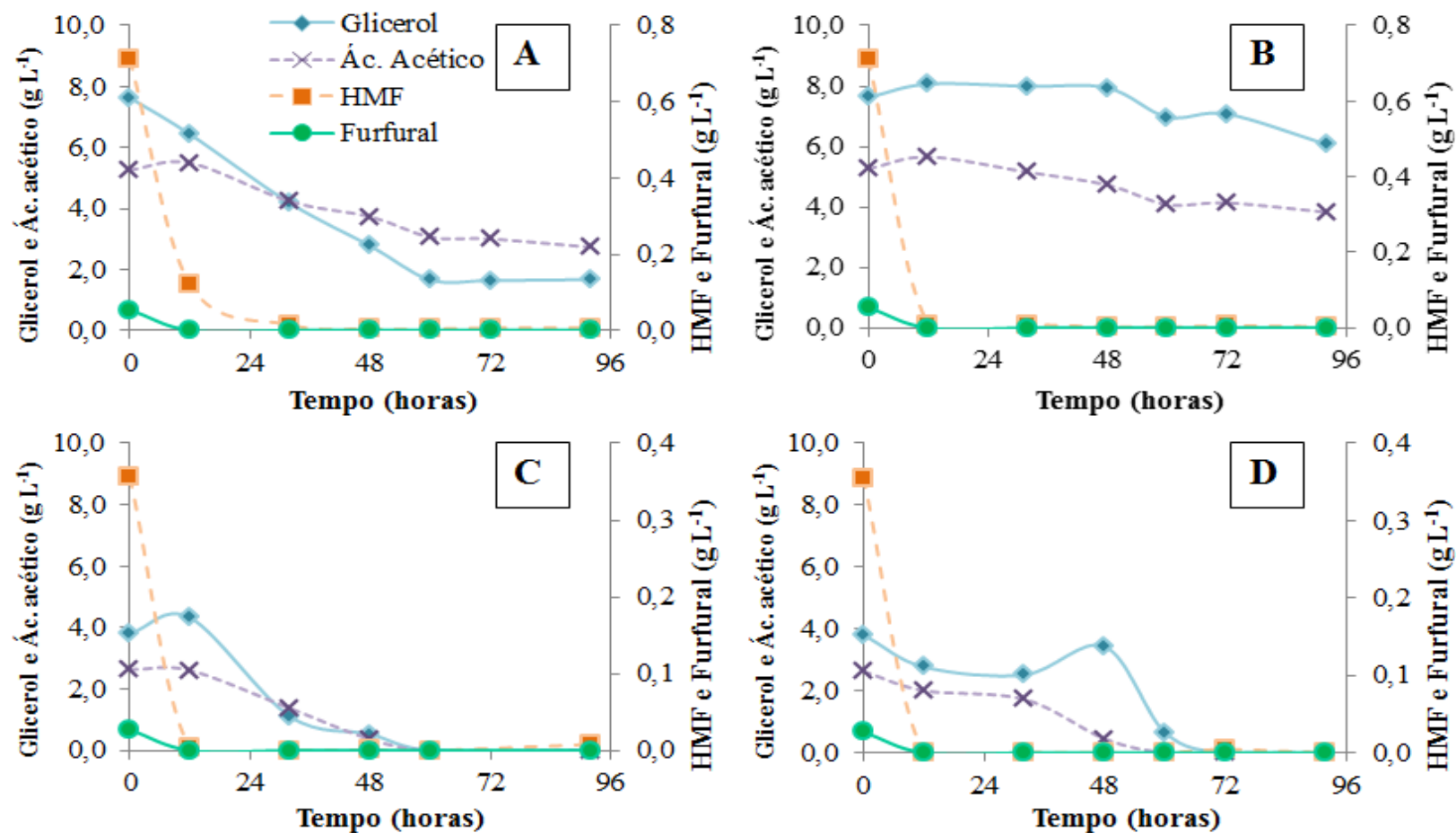
Dentre os inibidores encontrados no hidrolisado estudado da torta de girassol, o furfural e o HMF podem ser considerados os mais danosos para os micro-organismos. Ambos podem causar rompimento da membrana celular e interferir no metabolismo intracelular (VAN DER POL, 2014). Todavia, de acordo com Behera *et al.* (2014), o furfural apresenta efeitos mais acentuados se comparado a ação tóxica do HMF. O furfural inibe as enzimas do catabolismo primário do carbono, tais como, as hexoquinases, as aldolases e a triosefosfato desidrogenase. Contudo, esses dois furanos têm ação inibitória sobre outras enzimas, como aquelas importantes na conversão dos açúcares a etanol, como a piruvato desidrogenase e a aldeído desidrogenase (VAN DER POL, 2014). Estes compostos podem ainda, interferir em atividades moleculares causando redução na disponibilidade de NADH e ATP, bem como, causar relaxamento e quebra de DNA (SARRIS & PAPANIKOLAOU, 2016). Os ácidos acético, o fórmico e levulínico também podem afetar a membrana celular microbiana e



diminuir o pH interno, aumentando a pressão de turgor e, por consequência, causando a lise celular (HASUNUMA & KONDO, 2012).

No presente estudo, a concentração dos inibidores furfural e 5-hidroximetilfurfural, pesquisados no hidrolisado hemicelulósico, foram de 0,05 g L<sup>-1</sup> e 0,71 g L<sup>-1</sup>, respectivamente (TAB. 5). Tavares *et al.* (2016), estudando farelo de girassol pré-tratado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, obtiveram valores de 0,03 g L<sup>-1</sup> de furfural e 0,03 g L<sup>-1</sup> de 5-HMF. Estes valores contrapõem os dados encontrados por Antonopoulou *et al.* (2015), que também estudando farelo de girassol pré-tratado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, descrevem valores de 0,04 g L<sup>-1</sup> de furfural e 0,36 g L<sup>-1</sup> de 5-HMF. Dentre os inibidores formados na etapa de hidrólise da hemicelulose, foram ainda encontrados nesse estudo, concentrações de 5,26 g L<sup>-1</sup> de ácido acético. Este valor é superior aos encontrados por Tavares *et al.* (2016) e Antonopoulou *et al.* (2015) que obtiveram 3,56 g L<sup>-1</sup> e 0,85 g L<sup>-1</sup>, respectivamente, empregando, também, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como agente hidrolisante. De acordo com Gonzales *et al.* (2016), a concentração máxima de inibidores que um micro-organismo suporta pode variar, pois tal fato depende, do tipo de micro-organismo utilizado como agente fermentativo; da sua adaptação ao meio de fermentação; do tipo de processo fermentativo empregado e ainda, do efeito sinérgico de todos os inibidores presentes na solução. Todavia, no presente trabalho, alguns inibidores foram completamente consumidos ou biotransformados ao longo do processo fermentativo pelas leveduras estudadas (FIG. 13 e TAB 6). As linhagens *G. geotrichum* UFVJM-R10 e *C. akabanensis* UFVJM-R131 consumiram completamente o ácido acético presente no hidrolisado suplementado (FIG. 13C e 13D). Entretanto, no hidrolisado não suplementado o ácido acético foi consumido parcialmente e mais lentamente que no meio suplementado (FIG. 13A e 3B). O furfural foi consumido por ambos os micro-organismos nas primeiras 12 horas de fermentação (Tabela 13). O HMF foi consumido pelas duas espécies de leveduras em no máximo 36 horas após o início da fermentação nas condições sem e com suplementação (FIG. 13). Confirmando a capacidade de bioconversão dos compostos furfural e 5-hidroximetilfurfural por micro-organismos, Zhang, Han e Ezeji (2012), observaram em seus estudos que *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 possui a habilidade de bioconverter o furfural e 5-hidroximetilfurfural a álcool furfurílico e 2,5-bis-hidroximetilfurfurano, respectivamente.

**Figura 13** - Perfil do consumo de do glicerol, ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) pelas leveduras *G. geotrichum* UFVJM-R10 (A e C) e *C. akabanensis* UFVJM-R131 (B e D) nos sistemas fermentativos com o hidrolisado hemicelulósico de torta de girassol não suplementado (A e B) e suplementado (C e D)

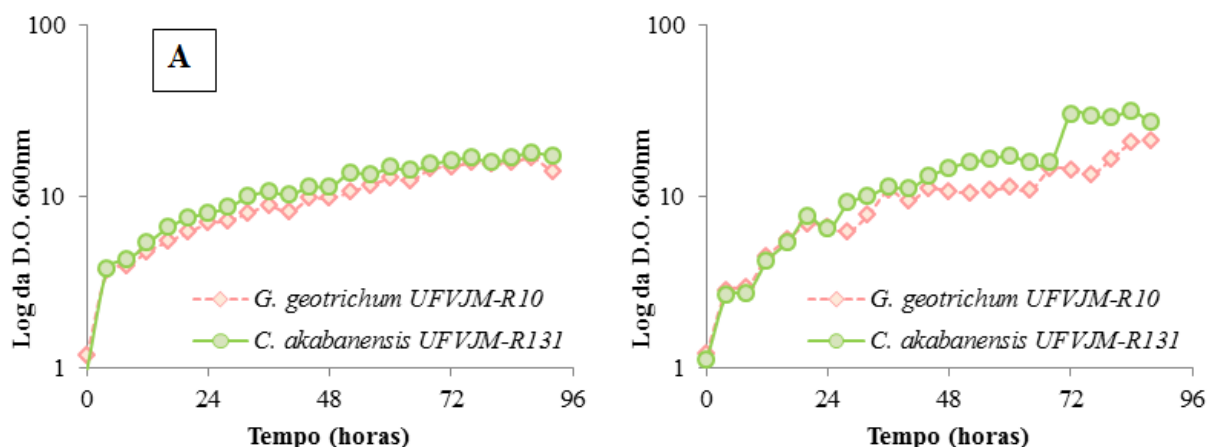


**Tabela 6** - Concentração dos compostos presentes no hidrolisado ácido hemicelulósico elaborado com meio suplementado e não suplementado, antes e após a fermentação.

		Tempo (h)	Componentes (g L <sup>-1</sup> )								
			D-glicose	D-Xilose	L-arabinose	Etanol	Xilitol	5-hidroximetilfurfural	Furfural	Ácido acético	Glicerol
Meio não suplementado	<i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R10	0	7,57±0,25	19,53±0,01	8,85±0,63	0,00±0,00	0,00±0,00	0,71±0,06	0,05±0,00	5,27±0,01	7,63±0,00
		12	6,11±0,92	15,30±0,75	6,26±0,53	0,00±0,00	0,00±0,00	0,12±0,03	0,00±0,00	5,49±0,11	6,43±0,21
		32	2,90±0,37	12,42±1,79	6,45±0,92	4,46±0,34	0,00±0,00	0,01±0,00	0,00±0,00	4,23±0,58	4,17±0,39
		48	0,77±0,70	9,82±0,97	6,26±0,09	<b>5,52±0,69</b>	0,00±0,00	0,00±0,01	0,00±0,00	3,73±0,19	2,77±0,35
		60	0,00±0,00	5,43±1,01	5,33±0,42	5,43±0,34	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	3,06±0,23	1,66±0,30
	<i>Candida akabensis</i> UFVJM-R131	0	7,57±0,25	19,53±0,01	8,85±0,63	0,00±0,00	0,00±0,00	0,71±0,06	0,05±0,00	5,27±0,01	7,63±0,00
		12	0,00±0,00	10,18±3,85	4,50±2,54	5,33±0,46	0,00±0,00	0,01±0,01	0,00±0,00	5,66±0,25	8,07±0,46
		32	0,00±0,00	4,90±0,31	5,52±0,38	<b>6,80±0,47</b>	0,00±0,00	0,01±0,00	0,00±0,00	5,15±0,39	7,99±0,47
		48	0,00±0,00	1,70±0,16	5,22±0,21	6,85±0,18	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	4,73±0,31	7,94±0,18
		60	0,00±0,00	0,42±0,03	4,17±0,36	6,13±0,35	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	4,08±0,14	6,98±0,35
Meio suplementado	<i>Galactomyces geotrichum</i> UFVJM-R10	0	3,79±0,13	9,77±0,01	4,43±0,31	0,00±0,00	0,00±0,00	0,36±0,03	0,03±0,00	2,63±0,00	3,82±0,00
		12	0,00±0,00	4,77±0,76	2,59±0,25	4,21±0,64	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	2,61±0,17	4,32±0,37
		32	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	<b>5,03±0,20</b>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,37±0,44	1,10±0,96
		48	0,00±0,00	0,03±0,04	1,26±0,28	1,16±2,01	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,36±0,63	0,53±0,91
		60	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	<i>Candida akabensis</i> UFVJM-R131	0	3,79±0,13	9,77±0,01	4,43±0,31	0,00±0,00	0,00±0,00	0,36±0,03	0,03±0,00	2,63±0,00	3,82±0,00
		12	0,00±0,00	1,75±1,49	0,84±1,18	<b>3,94±0,26</b>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	2,01±0,25	2,78±1,16
		32	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	4,25±0,85	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,73±0,79	2,52±0,72
		48	0,00±0,00	0,00±0,00	1,15±0,84	2,67±2,32	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,45±0,39	3,43±0,66
		60	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,13±1,96	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,46±0,79	0,65±1,13

Apesar da presença de inibidores no hidrolisado avaliado, foi notável o crescimento dos micro-organismos estudados (*G. geotrichum* UFVJM-R10 e *C. akabanensis* UFVJM-R131) durante o processo de fermentação alcoólica, mostrando assim, a capacidade de adaptação dessas células microbianas frente a esses compostos. As leveduras estudadas apresentaram um crescimento que as levaram de valores de D.O<sub>600nm</sub> iniciais próximos de 1 a valores entre 17 a 30 unidades de D.O<sub>600nm</sub> em 92 horas de fermentação (FIG.14). Segundo Landaeta *et al.* (2013), algumas leveduras apresentam a capacidade de converter compostos tóxicos, gerados na etapa de hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos, em compostos com menor toxicidade, porém com reflexo sobre a fase de latência, que se torna mais longa, e com consequente redução da produtividade. Neste estudo não foram observados efeitos dos inibidores presentes no hidrolisado ácido da torta de girassol que tivessem prolongado a fase lag de crescimento (FIG. 14) e nem prejudicado a eficiência fermentativa das duas espécies de leveduras avaliadas (TAB. 7).

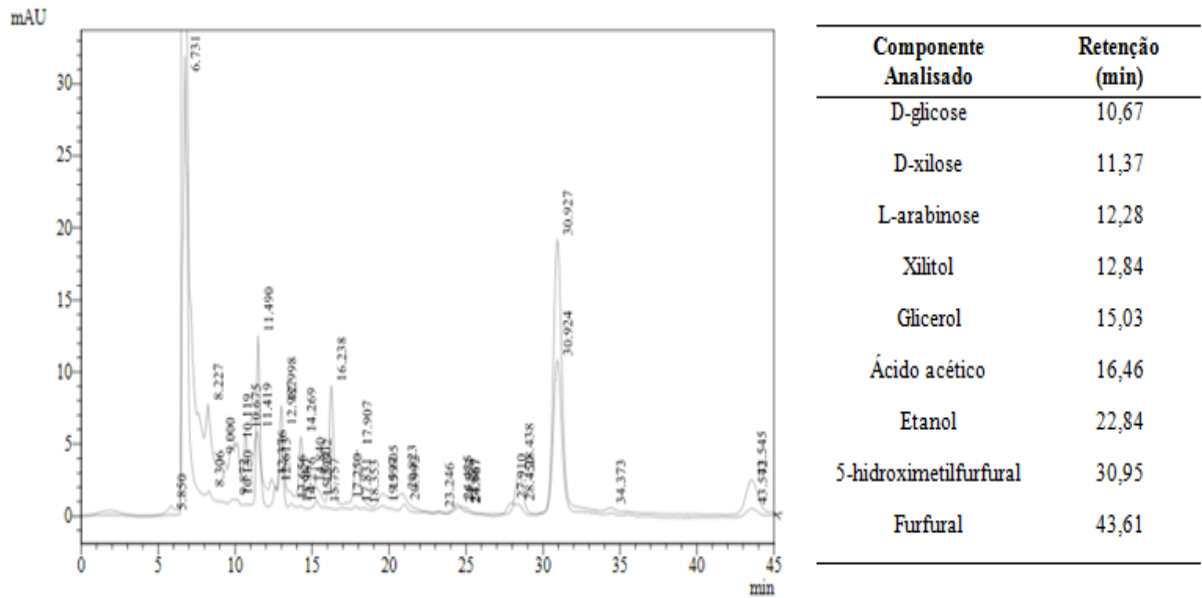
**Figura 14** - Perfil do crescimento celular baseado na leitura direta da densidade óptica (D.O<sub>600nm</sub>) das linhagens *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 e *Candida akabanensis* UFVJM-R131 durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico da torta de girassol não suplementada (A) e suplementada (B)



Suplementação de sais: 10 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 20,0 g L<sup>-1</sup> de peptona, 0,47 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 12,8 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,51 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,47 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O).

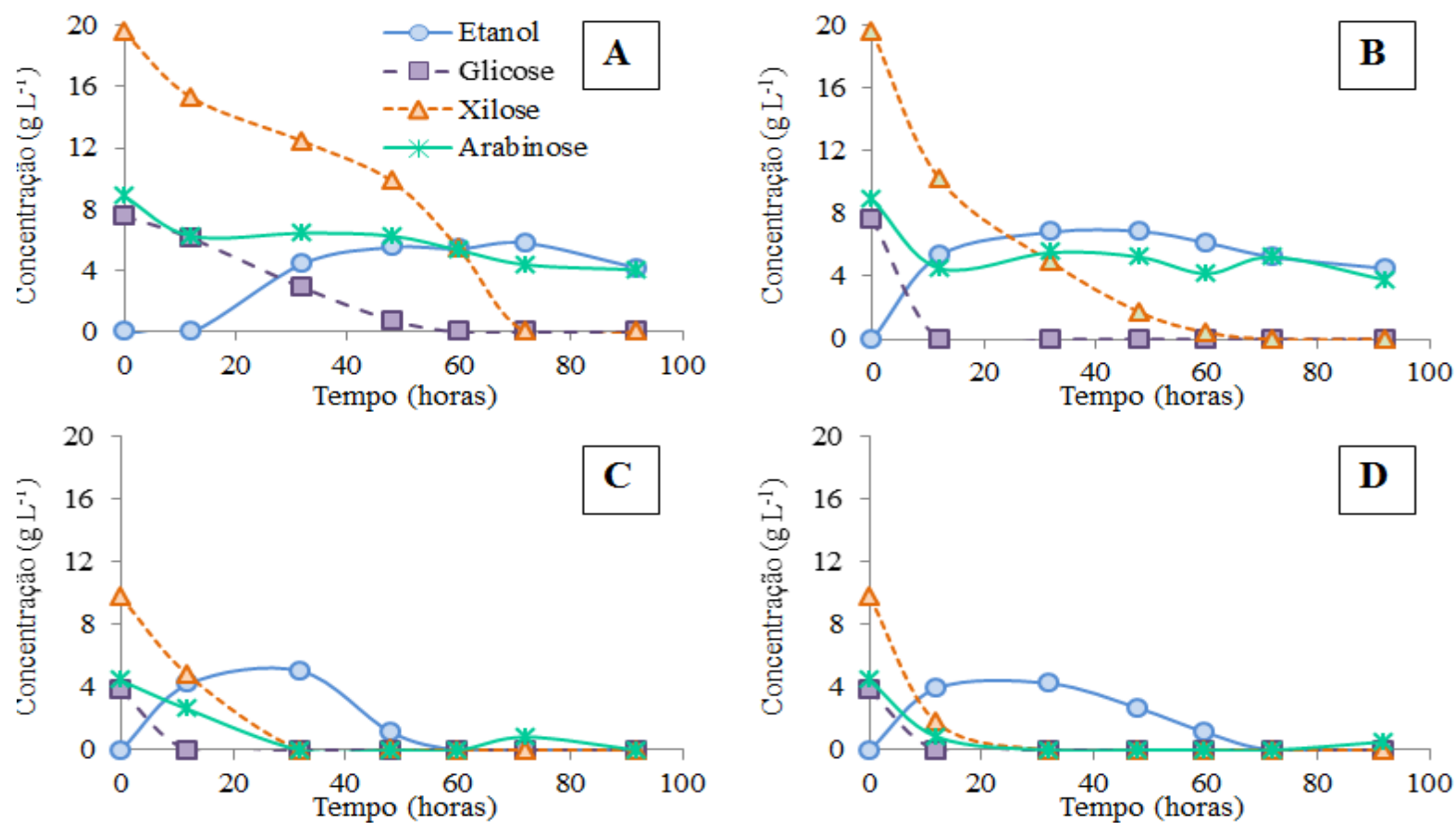
Na Figura 15 encontram-se um perfil cromatográfico dos resultados analisados nesse estudo, com o tempo específico de retenção de cada substância estudada (açúcares, álcoois e inibidores) presentes no hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de girassol. Os valores obtidos provenientes das análises cromatográficas para as diferentes condições estudadas encontram-se apresentadas na Tabela 6.

**Figura 15-** Perfil cromatográfico dos açúcares, álcoois e inibidores provenientes da amostra utilizando o meio hidrolisado ácido hemicelulósico da torta de girassol suplementado com nutrientes, empregando como agente fermentativo, a linhagem *Candida akabanensis* R131, com tempo de 24 horas de fermentação incubado a 28°C.



Durante a etapa de hidrólise da hemicelulose, como já relatado, são disponibilizados açúcares fermentescíveis, dentre estes, as hexoses e pentoses. Na Figura 16, encontram-se o perfil do consumo dos monossacarídeos analisados, D-glicose, D-xilose e L-arabinose, presentes nos processos fermentativos conduzidos com as linhagens *G. geotrichum* UFVJM-R10 e *C. akabanensis* UFVJM-R131.

**Figura 16** - Perfil do consumo de açúcares (D-glicose, D-xilose e L-arabinose) e produção de etanol pelas leveduras *G. geotrichum* UFVJM-R10 (A e C) e *C. akabanensis* UFVJM-R131 (B e D) nos sistemas fermentativos com o hidrolisado hemicelulósico de torta de girassol não suplementado (A e B) e suplementado com meio I (C e D)



Meio I: 10 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 20,0 g L<sup>-1</sup> de peptona, 0,47 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 12,8 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,51 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,47 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

A glicose foi totalmente consumida nas primeiras 12 horas pelo *G. geotrichum* UFVJM-R10 e *C. akabanensis* UFVJM-R131, nos meios suplementados (FIG. 16C e 16D). No meio não suplementado, apenas a *C. akabanensis* UFVJM-R131 foi capaz de consumir a glicose nas 12 primeiras horas (FIG. 16B). O perfil de consumo da glicose por *G. geotrichum* UFVJM-R10 no meio não suplementado foi semelhante ao do consumo da xilose, e foi concluído com 60 horas (FIG. 16A). No meio isento de suplementação (FIG. 16A e 16B), as linhagens consumiram apenas cerca de 40% da arabinose em 92 horas. A suplementação do hidrolisado com fontes de nitrogênio e minerais ativou o metabolismo das duas leveduras avaliadas de forma que nesta condição a glicose, xilose e arabinose foram totalmente esgotadas em apenas 32 horas e com taxas de consumo semelhantes (FIG. 16D e 16C). O consumo mais rápido de glicose em relação ao de xilose pode ser explicado devido à preferência de consumo das leveduras por este açúcar em relação a outros (CADETE *et al.*, 2009). Govindaswamy e Vane (2007) descreveram em seus estudos sobre mecanismos de utilização de açúcares, que o uso da glicose precede a utilização de D-xilose em meios de fermentação que contém a mistura dessas duas fontes de carbono. Reportam ainda, que, na cinética de crescimento, a utilização do açúcar e a produção de etanol se diferenciam à medida que se utiliza meios distintos à base de glicose ou de D-xilose. Segundo Schirmer-Michel *et al.* (2008), nas primeiras 24 horas de cultivo de leveduras, as hexoses (glicose e maltose) são esgotadas, seguidas por xilose e posteriormente arabinose. Esta ordem de consumo para monossacarídeos foi relatada também por Parajó, Domínguez e Domínguez (1998), reafirmando que a glicose é a fonte de carbono priorizada para a grande maioria dos micro-organismos.

Os resultados referentes à produção de etanol e parâmetros fermentativos estão apresentados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente. Os parâmetros de processo foram calculados considerando os tempos nos quais foram observados os maiores valores de concentração de etanol. Todavia, em tais tempos, a totalidade dos açúcares não foram necessariamente consumidos (FIG. 16).

**Tabela 7-** Parâmetros dos processos fermentativos conduzidos com as linhagens leveduriformes *G. geotrichum* UFVJM-R10 e *C. akabanensis* UFVJM-R131 e o hidrolisado hemicelulósico de torta de girassol não suplementado e suplementado

Parâmetros de Processo	Hidrolisado			
	sem suplementação		com suplementação (1:1)	
	UFVJM-R10 (48 h)	UFVJM-R131 (32 h)	UFVJM-R10 (32 h)	UFVJM-R131 (12 h)
Etanol (g L <sup>-1</sup> )	5,52±0,69 <sup>a</sup>	6,80±0,47 <sup>b</sup>	5,03±0,20 <sup>ad</sup>	3,94±0,26 <sup>cd</sup>
Y <sub>P/S</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	0,29±0,02 <sup>a</sup>	0,27±0,02 <sup>a</sup>	0,28±0,01 <sup>a</sup>	0,26±0,04 <sup>a</sup>
Q <sub>P</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0,12±0,01 <sup>a</sup>	0,21±0,01 <sup>b</sup>	0,16±0,01 <sup>c</sup>	0,33±0,02 <sup>d</sup>
Ef (%)	56,49±4,36 <sup>a</sup>	52,19±4,83 <sup>a</sup>	54,79±2,20 <sup>a</sup>	50,94±6,99 <sup>a</sup>

Solução de suplemento: 10 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 20,0 g.L<sup>-1</sup> de peptona, 0,47 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 12,8 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,51 g.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,47 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; Y<sub>P/S</sub> (g.g<sup>-1</sup>): rendimento da conversão dos açúcares a álcool; Q<sub>P</sub> (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>): Produtividade volumétrica de etanol; Ef (%): eficiência da fermentação alcoólica; UFVJM-R10: *G. geotrichum* UFVJM-R10; UFVJM-R131: *C. akabanensis* UFVJM-R13. Valores nas linhas (médias ± desvio-padrão) seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a  $p \leq 0,05$ .

A maior produção de etanol foi observada utilizando a levedura *C. akabanensis* UFVJM-131R (6,80 g L<sup>-1</sup>) como inóculo no hidrolisado não suplementado após 32 horas de fermentação. *G. geotrichum* UFVJM-R10 apresentou o melhor resultado de produção de etanol (5,52 g L<sup>-1</sup>) com 48h de fermentação no hidrolisado não suplementado. Em ambos os casos, podemos afirmar que o uso combinado da glicose e da xilose presentes no meio fermentativo foi necessário para se chegar aos valores destacados de etanol, pois a conversão exclusiva de glicose explicaria no máximo a produção de apenas 3,87 g L<sup>-1</sup> de etanol, no meio não suplementado, e de 3,47 g L<sup>-1</sup>, no meio suplementado. A conversão exclusiva da arabinose, por sua vez, representaria no máximo uma produção de 1,85 g L<sup>-1</sup> de etanol, no meio não suplementado, e de 1,32 g L<sup>-1</sup>, no meio suplementado. Os rendimentos Y<sub>P/S</sub> e por consequência a eficiência dos processos fermentativos conduzidos quer com o hidrolisado suplementado, quer com o hidrolisado não suplementado, não foram diferentes entre si (Teste de Tukey com  $p > 0,05$ ) e resultaram em valores próximos a 0,27 g etanol g<sup>-1</sup> açúcares, ou valores de eficiência fermentativa próximos a 53 % (Tabela 7).

Embora a suplementação não tenha contribuído para o aumento do rendimento, os valores de produtividade volumétrica (Q<sub>P</sub>) foram superiores no hidrolisado suplementado (Tabela 7). Isso implica dizer que os processos conduzidos com a suplementação de fontes de nitrogênio e minerais chegaram a produção máxima de etanol mais rapidamente (Tabela 7), após 48 horas no hidrolisado não suplementado contra 32 horas no hidrolisado suplementado,



usando *G. geotrichum* UFVJM-R10. E 32 horas no hidrolisado não suplementado contra 12 horas no hidrolisado suplementado, usando *C. akabanensis* UFVJM-131R.

Nos ensaios conduzidos com o hidrolisado suplementado, ambas as espécies de leveduras entraram em estado de diauxia e consumiram todo o etanol produzido. Foi possível observar que o consumo do etanol iniciou após o esgotamento de todos os monossacarídeos (FIG. 16C e 16D) e o consumo do glicerol (somente com *G. geotrichum* UFVJM-R10) (FIG. 13C) e do ácido acético presentes (FIG. 13C e 13D). O fenômeno de diauxia também teve reflexo na retomada do crescimento celular no hidrolisado suplementado, que foi observada após cerca de 72 horas do início do processo fermentativo (FIG. 14B). Possivelmente, o mesmo consumo de etanol não ocorreu no ensaio com o hidrolisado não suplementado porque a principal fonte de carbono (açúcares) não foi completamente esgotada na janela de tempo avaliada. Geistlinger *et al.* (2013), relataram em seus estudos envolvendo o fenômeno de diauxia em *S. cerevisiae*, que a glicose é a fonte preferencial para produção de energia e que, após depleção desse açúcar, as leveduras recorrem a uma fonte de carbono não fermentável como o etanol, lactato, glicerol ou ácidos graxos.

*C. akabanensis* UFVJM-131R não utilizou o glicerol presente no hidrolisado da torta de girassol (FIG 13B) quando a fermentação foi conduzida no hidrolisado não suplementado. E mesmo no hidrolisado suplementado, o consumo de glicerol foi muito inferior quando inoculado com a *G. geotrichum* UFVJM-R10 (Figura 13D). Não há na literatura registro do metabolismo de glicerol para *C. akabanensis*. Por outro lado há estudos de produção de glicerol por espécies do gênero *Candida* a partir de glicose (SIVASANKARAN *et al.*, 2014; ZHUGE *et al.*, 2001) e outros estudos de utilização do glicerol por espécies do gênero *Candida* como única fonte de carbono (RAIMONDI *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2013; SYVERSON, 1981). Dessa forma é inconclusivo a avaliação do comportamento esperado para *C. akabanensis*. Todavia, os dados obtidos indicam a importância de mais estudos relacionados a produção de etanol a partir destas linhagens fermentadoras de pentoses. Ressalta-se que as informações contidas na literatura envolvendo esses organismos na produção de etanol ainda são incipientes.



## 6 CONCLUSÃO

As leveduras *Candida akabanensis* UFVJM-R131 e *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 foram capazes de produzir etanol a partir da fração solúvel do hidrolisado ácido da torta de girassol a despeito da presença de ácido acético ( $5,27 \text{ g L}^{-1}$ ), furfural ( $0,05 \text{ g L}^{-1}$ ) e 5-hidroximetilfurfural ( $0,71 \text{ g L}^{-1}$ ), reconhecidos como inibidores fermentativos. As leveduras foram capazes de assimilar glicose, xilose, arabinose e glicerol. Foram também capazes de biodegradar o furfural, o 5-hidrometilfurfural e o ácido acético. Glicose e xilose foram fermentadas a etanol pelas duas leveduras. O rendimento dos processos fermentativos com base no consumo dos açúcares foi cerca de 50%. A suplementação do hidrolisado com meio contendo fontes de nitrogênio e minerais não afetou o rendimento, mas reduziu o tempo da fermentação em cerca de 40% para ambas as leveduras. As duas leveduras também mostraram-se capazes de consumir etanol após esgotamento dos carboidratos, processo conhecido como diauxia. Esta é a primeira vez, considerada a literatura disponível no banco de dados da ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com>) e em consulta ao sistema de buscas do Google Acadêmico (<https://scholar.google.com>), que as espécies de leveduras avaliadas foram empregadas na fermentação alcoólica de hidrolisado hemicelulósico.

Os dados obtidos geraram boas perspectivas para o melhor aproveitamento de açúcares provenientes das etapas de hidrólise de materiais lignocelulósicos, uma vez que o estudo realizado não foi desenvolvido em condições de otimização. Os resultados alcançados incentivam a otimização dos processos em busca das melhores condições de produção, bem como, abre perspectiva para o estudo fisiológico, bioquímico e genético das linhagens *C. akabanensis* e *G. geotrichum*, que possam balizar sua aplicação como produtoras de bioetanol.



## 7 REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A. L.; SILVA FILHO, J. C. D.; GODOI, A. R. D.; CARMO, C. D. A.; EDUARDO, J. L. D. P.. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. SPE, p. 260-268, 2008.
- AFONSO, A. F. **Protective effect of acetic acid against ethanol-induced cell death in "Saccharomyces cerevisiae"**. 2011. 66 f. Dissertação (Mestrado em Genética Molecular) - Universidade do Minho, Portugal. 2011.
- AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 675-685, 2011.
- AGUILAR-REYNOSA, A.; ROMANÍ, A.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; AGUILAR, C. N., GARROTE, G.; RUIZ, H. A. Microwave heating processing as alternative of pretreatment in second-generation biorefinery: An overview. **Energy Conversion and Management**, v. 136, p. 50-65, 2017.
- ALLEN, S. A., CLARK, W., McCAFFERY, J. M., CAI, Z., LANCTOT, A., SLININGER, P. J.; LIU, Z. L.; GORSICH, S. W. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 2, 2010.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.
- ANTONOPOULOU, G.; DIMITRELLOS, G.; BEOBIDE, A. S.; VAYENAS, D.; LYBERATOS, G. Chemical pretreatment of sunflower straw biomass: The effect on chemical composition and structural changes. **Waste and Biomass Valorization**, v. 6, n. 5, p. 733-746, 2015.
- ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. **Journal of radiation research and applied sciences**, v. 7, n. 2, p. 163-173, 2014.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. Washington: AOAC, 1992.
- BANERJEE, N.; BHATNAGAR, R.; VISWANATHAN, L. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 226-228, 1981.
- BARROS, E. M.; CARVALHO, V. M.; RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B. Comparison of strategies for the simultaneous saccharification and fermentation of cashew apple bagasse using a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* to

enhance cellulosic ethanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 307, p. 939-947, 2017.

BEHERA, S.; ARORA, R.; NANDHAGOPAL, N.; KUMAR, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 91-106, 2014.

BERŁOWSKA, J.; PIELECH-PRZYBYLSKA, K.; BALCEREK, M.; DZIEKOŃSKA-KUBCZAK, U.; PATELSKI, P.; DZIUGAN, P.; KRĘGIEL, D. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Sugar Beet Pulp for Efficient Bioethanol Production. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

BHUTTO, A. W.; QURESHI, K.; HARIJAN, K.; ABRO, R.; ABBAS, T.; BAZMI, A. A.; KARIM, S.; YU, G. Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. **Energy**, 2017.

BIDEAUX, C.; MONTHEARD, J.; CAMELEYRE, X.; MOLINA-JOUE, C.; ALFENORE, S. Metabolic flux analysis model for optimizing xylose conversion into ethanol by the natural C5-fermenting yeast *Candida shehatae*. **Microbiologia aplicada e biotecnologia**, v. 100, n. 3, p. 1489-1499, 2016.

BORSUK, L. J. **Cultivo de girassol sob a perspectiva da agroenergia: uma análise dos produtores familiares assentados de Abelardo Luz, SC**. 2008. 92f. Dissertação (Mestrado em Agrossistemas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2008.

BREXÓ, R. P. & SANT'ANA, A. S. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 423-434, 2017.

BRITO, P. L.; FERREIRA, A. C. M.; SILVA, A. F. F.; PANTOJA, A. L.; NELSON, D. L.; SANTOS, A. S. Hydrolysis, Detoxification and Alcoholic Fermentation of Hemicellulose Fraction from Palm Press Fiber. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-12, 2017.

BUCKERIDGE, M. S.; CAVALARI, A. A.; SILVA, G. B. Parede celular. **Fisiologia vegetal**, p. 165-181, 2008.

CADETE, R. M.; ALEJANDRO, M.; SANDSTRÖM, A. G.; FERREIRA, C.; GÍRIO, F.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; ROSA, C. A. FONSECA, C. Exploring xylose metabolism in *Spathaspora species*: XYL1. 2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 167, 2016.

CADETE, R. M.; SANTOS, R. O.; MELO, M. A.; MOURO, A.; GONÇALVES, D. L.; STAMBUK, B. U.; GOMES, F. C. O.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 1338-1342, 2009.

Fátima C.O. Marc-André

CAMARGO, D. **Aproveitamento das frações hemicelulósicas e celulósicas dos resíduos do processamento do girassol para a produção de bioetanol**. 2012. 94. f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola)- Universidade do Oeste do Paraná – *Campus Cascavel*, Cascavel, Paraná, 2012.

CAMARGO, D.; GOMES, S. D.; FELIPE, M. D. G. D. A.; SENE, L. Response of by-products of sunflower seed processing to dilute-acid hydrolysis aiming fermentable sugar production. **Journal of Food Agriculture and Environment**, v. 12, n. 2, p. 239- 246, 2014.

CANABARRO, N. I.; ALESSIO, C.; FOLETTO, E. L.; KUHN, R. C.; PRIAMO, W. L.; MAZUTTI, M. A. Ethanol production by solid-state saccharification and fermentation in a packed-bed bioreactor. **Renewable Energy**, v. 102, p. 9-14, 2017.

CAO, S.; PU, Y.; STUDER, M.; WYMAN, C.; RAGAUSKAS, A. J. Chemical transformations of *Populus trichocarpa* during dilute acid pretreatment. **Rsc Advances**, v. 2, n. 29, p. 10925-10936, 2012.

CAPOLUPO, L. & FARACO, V. Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 22, p. 9451-9467, 2016.

CASAL, M.; CARDOSO, H.; LEÃO, C. Effects of ethanol and other alkanols on transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 2, p. 665-668, 1998.

CASTRO, A.M.; DOS REIS CASTILHO, L.; FREIRE, D. M. G. Characterization of babassu, canola, castor seed and sunflower residual cakes for use as raw materials for fermentation processes. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 140-148, 2016.

CHEN, Z. & WAN, C. Biological valorization strategies for converting lignin into fuels and chemicals. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 610-621, 2017.

DE PAULA, C. C. F. & FATURI, C. Avaliação da torta de dendê para alimentação de ruminantes na região amazônica. **VI Seminário de Iniciação Científica da UFRA e XII Seminário de Iniciação Científica da Amazônia Oriental**, 2008.

DUNLOP, M. J. Engineering microbes for tolerance to next-generation biofuels. **Biotechnology for biofuels**, v. 4, n. 1, p. 32, 2011.

DOMÍNGUEZ, E.; ROMANÍ, A.; DOMINGUES, L.; GARROTE, G. Evaluation of strategies for second generation bioethanol production from fast growing biomass *Paulownia* within a biorefinery scheme. **Applied Energy**, v. 187, p. 777-789, 2017.

FARIAS, D.; ATALA, D. I. P.; MAUGERI FILHO, F. M. Melhorar a produção de bioetanol por *Scheffersomyces stipitis* utilizando fermentação extractiva de retentostat com alta concentração de xilose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 121, p. 171-180, 2017.

FAVARO, L.; BASAGLIA, M.; VAN ZYL, W. H.; CASELLA, S. Using an efficient fermenting yeast enhances ethanol production from unfiltered wheat bran hydrolysates. **Applied energy**, v. 102, p. 170-178, 2013.

FERON, V. J.; TIL, H. P.; VRIJER, F.; WOUTERSEN, R. A.; CASSEE, F. R.; VAN BLADEREN, P. J. Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 259, n. 3-4, p. 363-385, 1991.

FENGEL, D. & WEGENER, G. (Ed.). **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Walter de Gruyter, 1983.

FERNÁNDEZ-CEGRÍ, V.; DE LA RUBIA, M. Á.; RAPOSO, F.; BORJA, R. Effect of hydrothermal pretreatment of sunflower oil cake on biomethane potential focusing on fibre composition. **Bioresource technology**, v. 123, p. 424-429, 2012.

FERREIRA, C. M. A.; SANTOS, R. S.; SILVA, R.; SANTOS, A. S. Composição centesimal da torta de dendê: avaliação do potencial para produção de bioetanol. In: VII Encontro da Rede de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Biocombustíveis de Minas Gerais, 2012, Sete Lagoas. **Anais do VII Encontro da Rede de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Biocombustíveis de Minas Gerais**, 2012.

FRANCKIN, T. **Produção de biofilme, perfil de sensibilidade e aspectos epidemiológicos de espécies fúngicas e algas do gênero *Prototheca* isoladas de casos de mastite bovina**. 2016. 29 f. Dissertação ( Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) - Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, São Paulo, 2016.

FREGOLANTE, P. B.; FREGOLANTE, L. V.; MACIEL, M. R.; CARVALHO, P. O. Screening of microbial lipases and evaluation of their potential to produce glycerides with high gamma linolenic acid concentration. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 747-756, 2009.

FOSSO-KANKEU, E.; MARX, S.; MEYER, A. Simulated inhibitory effects of typical byproducts of biomass pretreatment process on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* and bioethanol production yield. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 30, p. 2383-2394, 2015.

GANDINI, A. & BELGACEM, M. N. Lignins as components of macromolecular materials. **Elsevier**, Amsterdam, p. 143-171, 2008.

GÁRDONYI, M.; ÖSTERBERG, M.; RODRIGUES, C.; SPENCER-MARTINS, I.; HAHN-HÄGERDAL, B. High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. **FEMS Yeast Research**, n. 3, p. 45-52, 2003.

GEISTLINGER, L.; CSABA, G.; DIRMEIER, S.; KÜFFNER, R.; ZIMMER, R. A comprehensive gene regulatory network for the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic acids research**, p. 631, 2013.

GENTE, S.; DESMASURES, N.; PANOFF, J. M.; GUEGUEN, M. Genetic diversity among *Geotrichum candidum* strains from various substrates studied using RAM and RAPD-PCR. **Journal of applied microbiology**, v. 92, n. 3, p. 491-501, 2002.



GENTIL, R. M.; SERRA, J. C. V.; CASTRO, R. B. Resíduos sólidos orgânicos provenientes da extração de oleaginosas para biodiesel e seus potenciais de uso. **Geoambiente on-line**, n. 18, p. 127-142., 2012.

GHASIMI, D. S.; ABOUDI, K.; DE KREUK, M.; ZANDVOORT, M. H.; VAN LIER, J. B. Impact of lignocellulosic-waste intermediates on hydrolysis and methanogenesis under thermophilic and mesophilic conditions. **Chemical Engineering Journal**, v. 295, p. 181-191, 2016.

GIANNATTASIO, S.; GUARAGNELLA, N.; CORTE-REAL, M.; PASSARELLA, S.; MARRA, E. Acid stress adaptation protects *Saccharomyces cerevisiae* from acetic acid-induced programmed cell death. **Gene**, v. 354, p. 93-98, 2005.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

GRANBIO, 2017. Disponível em: <[www.granbio.com.br](http://www.granbio.com.br)> Acesso em: 22/05/2017.

GONZALES, R. R.; SIVAGURUNATHAN, P.; PARTHIBAN, A.; KIM, S. H. Optimization of substrate concentration of dilute acid hydrolyzate of lignocellulosic biomass in batch hydrogen production. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 113, p. 22-27, 2016.

GORDOBIL, O.; MORIANA, R.; ZHANG, L.; LABIDI, J.; SEVASTYANOVA, O. Assesment of technical lignins for uses in biofuels and biomaterials: Structure-related properties, proximate analysis and chemical modification. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 155-165, 2016.

GOTO, M. & KAMIYA, N. Powerful peracetic acid–ionic liquid pretreatment process for the efficient chemical hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 214, p. 487-495, 2016.

GOVINDASWAMY, S. & VANE, L.M. Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xilose-fermenting yeast. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 677–685, 2007.

GUPTA, A. & VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550-567, 2015.

HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 933-943, 1994.

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 937-953, 2007.

HASUNUMA, T. & KONDO, A. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1207-1218, 2012.

HERBERT, D.; ELSWORTH, R.; TELLING, R. C. The continuous culture of bacteria; a theoretical and experimental study. **Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 601-622, 1956.

HENDRIKS, A. T. W. M. & ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009.

HEIPIEPER, H. J.; WEBER, F. J.; SIKKEMA, J.; KEWELOH, H.; DE BONT, J. A. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. **Trends in Biotechnology**, v. 12, n. 10, p. 409-415, 1994.

HIGUCHI, T. Biodegradation of lignin: biochemistry and potential applications. In: New Trends in Research and Utilization of Solar Energy through Biological Systems. **Birkhäuser Basel**, p. 87-94, 1982.

HISS, H. (Ed.). **Cinética de Fermentações**: Uma análise matemática da atividade microbiana. São Paulo: Edição do Autor, 2013. 654p. ISBN 9878591569519

HOOG, G.S. & SMITH, M. T. *Galactomyces Redheah & Malloch* (1977). In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. (Eds). *The Yeasts: a taxonomic study*. Fifth Revised and Enlarged Edition. **Amsterdam: Elsevier**, Cap. 31. 2011.

HOŞGÜN, E. Z.; BERIKTEN, D.; KIVANÇ, M.; BOZAN, B. Ethanol production from hazelnut shells through enzymatic saccharification and fermentation by low-temperature alkali pretreatment. **Fuel**, v. 196, p. 280-287, 2017.

IBRAHEEM, O. & NDIMBA, B. K. Molecular adaptation mechanisms employed by ethanologenic bacteria in response to lignocellulose-derived inhibitory compounds. **International journal of biological sciences**, v. 9, n. 6, p. 598, 2013.

JACKSON, S. & NICOLSON, S. W. Xylose as a nectar sugar: from biochemistry to ecology. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 131, n. 4, p. 613-620, 2002.

JAMES, S. A.; BARRIGA, E. J. C.; BARAHONA, P. P.; CROSS, K.; BOND, C. J.; ROBERTS, I. N. *Candida ecuadorensis* sp. nov., an ascomycetous yeast species found in two separate regions of Ecuador. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 393-397, 2013.

JENSEN, J. R.; MORINELLY, J. E.; GOSSEN, K. R.; BRODEUR-CAMPBELL, M. J.; SHONNARD, D. R Effects of dilute acid pretreatment conditions on enzymatic hydrolysis monomer and oligomer sugar yields for aspen, balsam, and switchgrass. **Bioresource technology**, v. 101, n. 7, p. 2317-2325, 2010.

JONSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 16, 2013.

- JONSSON, L. J. & MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource technology**, v. 199, p. 103-112, 2016.
- KAMOLDEEN, A. A. *et al.* Enhanced ethanol production from mild alkali-treated oil-palm empty fruit bunches via co-fermentation of glucose and xylose. **Renewable Energy**, v. 107, p. 113-123, 2017.
- KIM, S. & DALE, B. E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass and Bioenergy**, v. 26, n. 4, p. 361-375, 2004.
- JENSEN, J. R., MORINELLY, J. E., GOSSEN, K. R., BRODEUR-CAMPBELL, M. J., & SHONNARD, D. R. Genetic improvement of xylose metabolism by enhancing the expression of pentose phosphate pathway genes in *Saccharomyces cerevisiae* IR-2 for high-temperature ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, p. 1-13, 2017.
- KUHAD, R. C., GUPTA, R., KHASA, Y. P., SINGH, A., & ZHANG, Y. H. P. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 9, p. 4950-4962, 2011.
- KUMAR, A. K. & SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, p. 7, 2017.
- KUMAR, R.; SHARMA, R. K.; SINGH, A. P. Cellulose based grafted biosorbents-Journey from lignocellulose biomass to toxic metal ions sorption applications-A review. **Journal of Molecular Liquids**, v. 232, p. 62-93, 2017.
- LANCEFIELD, C. S., PANOVIC, I., DEUSS, P. J., BARTA, K., & WESTWOOD, N. J. Pre-treatment of lignocellulosic feedstocks using biorenewable alcohols: towards complete biomass valorisation. **Green Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 202-214, 2017.
- LANDAETA, R., AROCA, G., ACEVEDO, F., TEIXEIRA, J. A., & MUSSATTO, S. I. Adaptation of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain to lignocellulosic inhibitors by cell recycle batch fermentation. **Applied energy**, v. 102, p. 124-130, 2013.
- LANJEKAR, R.D. & DESHMUKH, D. A review of the effect of the composition of biodiesel on NOx emission, oxidative stability and cold flow properties. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 54, p.1401–1411, 2016.
- LEE, W. & JIN, Y. Improved ethanol production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing a mutated cellobiose transporter during simultaneous saccharification and fermentation. **Journal of Biotechnology**, v. 245, p. 1-8, 2017.
- LEITÃO, V. O. **Caracterização de uma bactéria anaeróbica termofílica isolada do rúmen de caprino e análise das enzimas do seu complexo celulolítico**. 2015. 99 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília. 2015.
- LISOV, A. V., BELOVA, O. V., LISOVA, Z. A., VINOKUROVA, N. G., NAGEL, A. S., ANDREEVA-KOVALEVSKAYA, Z. I., BUDARINA, Z. I., NAGORNYKH, M. O. ZAKHAROVA, M. V. SHADRIN, A. M., SOLONIN, A. S. & SOLONIN, A. S. A.

Xylanases of *Cellulomonas flavigena*: expression, biochemical characterization, and biotechnological potential. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 5, 2017.

LESSARD, M. H., VIEL, C., BOYLE, B., ST-GELAIS, D., & LABRIE, S. Metatranscriptome analysis of fungal strains *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* reveal cheese matrix breakdown and potential development of sensory properties of ripened Camembert-type cheese. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 235, 2014.

LU, H., LV, C., ZHANG, M., LIU, S., LIU, J., & LIAN, F. Optimization of hydrothermal pretreatment for co-utilization C-5 and C-6 sugars of cassava alcohol residue. **Energy Conversion and Management**, v. 132, p. 251-260, 2017.

LUDOVICO, P., RODRIGUES, F., ALMEIDA, A., SILVA, M. T., BARRIENTOS, A., & CÔRTE-REAL, M. Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular biology of the cell**, v. 13, n. 8, p. 2598-2606, 2002.

MACEDO, A.L.; SANTOS, R.S.; PANTOJA, L.; PINTO, N. A. V. D.; SANTOS, A. S. Avaliação do aproveitamento da torta de mamona (*Ricinus communis*) para produção de bioetanol. In: 6º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2009, Montes Claros. **Anais Completos do 6º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel**, 2009.

MACHADO, A. S. & FERRAZ, A. Biological pretreatment of sugarcane bagasse with basidiomycetes producing varied patterns of biodegradation. **Bioresource Technology**, v. 225, p. 17-22, 2017.

MACIEL, M. P., SOARES, T. M., GHEYI, H. R., REZENDE, E. P., & OLIVEIRA, G. X. Produção de girassol ornamental com uso de águas salobras em sistema hidropônico NFT. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 2, p. 165-172, 2012.

MALDONADO, R. R., LOPES, D. B., AGUIAR-OLIVEIRA, E., KAMIMURA, E. S., & MACEDO, G. A. A Review on *Geotrichum* Lipases: Production, Purification, Immobilization and Applications. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 30, n. 4, p. 439-454, 2017.

MARCELLINO, N., BEUVIER, E., GRAPPIN, R., GUÉGUEN, M., & BENSON, D. R. Diversity of *Geotrichum candidum* Strains Isolated from Traditional Cheesemaking Fabrications in France. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4752-4759, 2001.

MAROUŠEK, J. Pretreatment of sunflower stalks for biogas production. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 15, n. 4, p. 735-740, 2013.

MARTÍNEZ-PATIÑO, J. C., ROMERO, I., RUIZ, E., CARA, C., ROMERO-GARCÍA, J. M., & CASTRO, E. Design and Optimization of Sulfuric Acid Pretreatment of Extracted Olive Tree Biomass Using Response Surface Methodology. **BioResources**, v. 12, n. 1, p. 1779-1797, 2017.

- MARTINS, G. M. **Isolamento e seleção de leveduras fermentadoras de xilose**. 2011. 104 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* de São José do Rio Preto, São Paulo, 2011.
- MATOS, I. T. S. R., CASSA-BARBOSA, L. A., GALVÃO, R. D. S. M., NUNES-SILVA, C. G., & ASTOLFI FILHO, S. Isolation, taxonomic identification and investigation of the biotechnological potential of wild-type *Meyerozyma guilliermondii* associated with Amazonian termites able to ferment D-xylose. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 260-266, 2014.
- MCCREADY, R. M., GUGGOLZ, J., SILVIERA, V., & OWENS, H. S. Determination of starch and amylose in vegetables. Application to pear. **Analytical Chemistry**, v.22, p. 1156, 1950.
- MENON, V. & RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522-550, 2012.
- MILLER, G. L. Use of Dinitro-salicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MILLS, T. Y.; SANDOVAL, N. R.; GILL, R. T. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. **Biotechnology for biofuels**, v. 2, n. 1, p. 26, 2009.
- MODIG, T.; LIDEN, G.; TAHERZADEH, M. J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochemical Journal**, v. 363, n. 3, p. 769-776, 2002.
- MONLAU, F., AEMIG, Q., TRABLY, E., HAMELIN, J., STEYER, J. P., & CARRERE, H. Specific inhibition of biohydrogen-producing *Clostridium* sp. after dilute-acid pretreatment of sunflower stalks. **International journal of hydrogen energy**, v. 38, n. 28, p. 12273-12282, 2013.
- MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y. Y., HOLTZAPPLE, M., & LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.
- MOOD, S. H., GOLFESHAN, A. H., TABATABAEI, M., JOUZANI, G. S., NAJAFI, G. H., GHOLAMI, M., & ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.
- NASEERUDDIN, S.; DESAI, S.; RAO, L. Venkateswar. Ethanol production from lignocellulosic substrate *Prosopis juliflora*. **Renewable Energy**, v. 103, p. 701-707, 2017.
- NAUREEN, R., TARIQ, M., YUSOFF, I., CHOWDHURY, A. J. K., & ASHRAF, M. A. Synthesis, spectroscopic and chromatographic studies of sunflower oil biodiesel using optimized base catalyzed methanolysis. **Saudi journal of biological sciences**, v. 22, n. 3, p. 332-339, 2015.

NEGAHDAR, L.; DELIDOVICH, I.; PALKOVITS, R. Aqueous-phase hydrolysis of cellulose and hemicelluloses over molecular acidic catalysts: Insights into the kinetics and reaction mechanism. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 184, p. 285-298, 2016.

NEVES, P. V.; PITARELO, A. P.; RAMOS, L. P. Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse by steam explosion: Effect of extractives content, acid catalysis and different fermentation technologies. **Bioresource technology**, v. 208, p. 184-194, 2016.

NGUYEN, N. H., SUH, S. O., MARSHALL, C. J., & BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, v. 110, p. 1232-1241, 2006.

NIGAM, J. N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 17-27, 2001.

NOGUÉ, V.S. & KARHUMAA, K. Xylose fermentation as a challenge of a commercialization of lignocellulosic fuels and chemicals. **Biotechnology Letter**, v. 37, p. 761-772, 2015.

OLIVEIRA, M. E<sub>2</sub>G: A vez da biotecnologia na biomassa. **Revista FAPESP**, Ed. 235, Set. 2015. Disponível em: < <http://revistapesquisa.fapesp.br/2015/09/15/a-vez-da-biotecnologiana-biomassa/> > Acesso em: 22/05/2017.

OSIRO, K. O., DE CAMARGO, B. R., SATOMI, R., HAMANN, P. R. V., SILVA, J. P., DE SOUSA, M. V., QUIRINO, B. F., AQUINO, E.A., FELIX, C. R.. Characterization of *Clostridium thermocellum* (B8) secretome and purified cellulosomes for lignocellulosic biomass degradation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 97, p. 43-54, 2017.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, v. 66, n. 1, p. 25-40, 1998.

PALMQVIST, E., GRAGE, H., MEINANDER, N. Q., & HAHN-HAEGERDAL, B. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. **Biotechnology and bioengineering**, v. 63, n. 1, p. 46-55, 1999.

PALMQVIST, E. & HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 17-24, 2000.

PAMPULHA, M. E. & LOUREIRO-DIAS, M. C. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 547-550, 1989.

PARK, Y. C. & KIM, J. S. Comparison of various alkaline pretreatment methods of lignocellulosic biomass. **Energy**, v. 47, n. 1, p. 31-35, 2012.

PÉREZ-PIMIENTA, J. A., VARGAS-TAH, A., LÓPEZ-ORTEGA, K. M., MEDINA-LÓPEZ, Y. N., MENDOZA-PÉREZ, J. A., AVILA, S., SINGH, S., MARTINEZ, A. Sequential enzymatic saccharification and fermentation of ionic liquid and organosolv

pretreated agave bagasse for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 225, p. 191-198, 2017.

PIMENTEL, D. & PATZEK, T. W. Ethanol production using corn, switchgrass, and wood; biodiesel production using soybean and sunflower. **Natural resources research**, v. 14, n. 1, p. 65-76, 2005.

PINTO, I., CARDOSO, H., LEÃO, C., & VAN UDEN, N. High enthalpy and low enthalpy death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by acetic acid. **Biotechnology and bioengineering**, v. 33, n. 10, p. 1350-1352, 1989.

PREEZ, J. C.; BOSCH, M.; PRIOR, B. A. The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 228-233, 1986.

QUEMENEUR, M., HAMELIN, J., BARAKAT, A., STEYER, J. P., CARRERE, H., & TRABLY, E. Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. **International journal of hydrogen energy**, v. 37, n. 4, p. 3150-3159, 2012.

RABEMANOLONTSOA, H. & SAKA, S. Various pretreatments of lignocellulosics. **Bioresource technology**, v. 199, p. 83-91, 2016.

RAIMONDI, S., ROSSI, M., LEONARDI, A., BIANCHI, M. M., RINALDI, T., & AMARETTI, A. Getting lipids from glycerol: new perspectives on biotechnological exploitation of *Candida freyschussii*. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 83, 2014.

RAIZEN, 2017. Disponível em: < <http://www.raizen.com.br/energia-do-futuro/tecnologia-em-energia-renovavel>>. Acesso em: 23/05/2017.

RAN, H., ZHANG, J., GAO, Q., LIN, Z., & BAO, J. Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 51, 2014.

RAO, R.S.; BHADRA, B.; SHIVAJI, S. Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks. **Applied Microbiology**, v. 47, p. 19-24, 2008.

RAVINDRAN, R. & JAISWAL, A.K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. **Bioresource technology**, v. 199, p. 92-102, 2016.

RIBEIRO, G. F.; CÔRTE-REAL, M.; JOHANSSON, B. Characterization of DNA damage in yeast apoptosis induced by hydrogen peroxide, acetic acid, and hyperosmotic shock. **Molecular biology of the cell**, v. 17, n. 10, p. 4584-4591, 2006.

ROSSI, R. O. Girassol. Curitiba: **TecnoAgro**, 333 p., 1998.

RYABOVA, O. B.; CHMIL, O. M.; SIBIRNY, A. A. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 157-164, 2003.

SÁ, V.; CAMAROTAN, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia—aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 857-867, 2014.

SAMUEL, R., PU, Y., RAMAN, B., & RAGAUSKAS, A. J. Structural characterization and comparison of switchgrass ball-milled lignin before and after dilute acid pretreatment. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 162, n. 1, p. 62-74, 2010.

SANNIGRAHI, P., KIM, D. H., JUNG, S., & RAGAUSKAS, A. Pseudo-lignin and pretreatment chemistry. **Energy & Environmental Science**, v. 4, n. 4, p. 1306-1310, 2011.

SANTIAGO-URBINA, J. A., PEÑA-MONTES, C., NOLASCO-CANCINO, H., & RUIZ-TERÁN, F. PCR-DGGE Analysis of the yeast population associated with natural fermentation of taberna. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2016, p. 758-763, 2016.

SANTOS, E. O., MICHELON, M., GALLAS, J. A., KALIL, S. J., & BURKERT, C. A. V. Raw glycerol as substrate for the production of yeast biomass. **Int J Food Eng**, v. 9, n. 4, p. 413-420, 2013.

SANTOS, F. A., QUEIRÓZ, J. D., COLODETTE, J. L., FERNANDES, S. A., GUIMARÃES, V. M., & REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, R. S. **Produção de hidrolases holocelulolíticas por fermentação em estado sólido com uso de fungos filamentosos e coprodutos da agroindústria de óleos vegetais como fontes de carbono**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biocombustíveis)- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina, Minas Gerais, 2015.

SANTOS, R.S., PIMENTA, J. L. P.; COURA, A. P.; MACEDO, A. L.; VANZELA; A. P. F. C.; PANTOJA, L. A.; SANTO, A.S. Avaliação de coprodutos sólidos da cadeia do biodiesel como fonte de carbono para produção de enzimas holocelulolíticas sintetizadas por *Aspergillus tubingensis* AN1257. **Revista Sodebras**, v. 10, n. 112, p. 11-16, 2015.

SARKAR, N., GHOSH, S. K., BANNERJEE, S., & AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19-27, 2012.

SARITHA, M. & ARORA, A. Biological pretreatment of lignocellulosic substrates for enhanced delignification and enzymatic digestibility. **Indian journal of microbiology**, v. 52, n. 2, p. 122-130, 2012.

SARRIS, D. & PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies. **Engineering in Life Sciences**, v 16, p. 307–329, 2016.

SCHELLER, H. V. & ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual review of plant biology**, v. 61, p. 263-289, 2010.



Schirmer-Michel, Â. C., Flôres, S. H., Hertz, P. F., Matos, G. S., & Ayub, M. A. Z. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource technology**, v. 99, n. 8, p. 2898-2904, 2008.

SCHWARTZ, T. J. & LAWOKO, M.. Removal of acid-soluble lignin from biomass extracts using Amberlite XAD-4 resin. **BioResources**, v. 5, n. 4, p. 2337-2347, 2010.  
 SHAHZADI, T. *et al.* Advances in lignocellulosic biotechnology: A brief review on lignocellulosic biomass and cellulases. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, n. 5, p. 246-251, 2014.

SHUAI, L., YANG, Q., ZHU, J. Y., LU, F. C., WEIMER, P. J., RALPH, J., & PAN, X. J. Comparative study of SPORL and dilute-acid pretreatments of spruce for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 9, p. 3106-3114, 2010.

SKOOG, K. & HÄHN-HÄGERDAL, B. Xylose fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 2, p. 66-80, 1988.

SILVA, D. D., ARRUDA, P. V., DUSSÁN, K. J., & FELIPE, M. G. Adaptation of *Scheffersomyces stipitis* Cells as a Strategy to the Improvement of Ethanol Production from Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate. **Chemical Engineering**, v. 38, 2014.

SINDHU, R., KUTTIRAJA, M., PRABISHA, T. P., BINOD, P., SUKUMARAN, R. K., & PANDEY, A. Development of a combined pretreatment and hydrolysis strategy of rice straw for the production of bioethanol and biopolymer. **Bioresource technology**, v. 215, p. 110-116, 2016.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—An overview. **Bioresource technology**, v. 199, p. 76-82, 2016.

SINGH, Y. D.; MAHANTA, P; BORA, U. Comprehensive characterization of lignocellulosic biomass through proximate, ultimate and compositional analysis for bioenergy production. **Renewable Energy**, v. 103, p. 490-500, 2017.

SIQUEIRA, M. R. **Efeito dos produtos de hidrólise de materiais lignocelulósicos sobre a produção de H<sub>2</sub> por fermentação**. 2015. 86 f. Dissertação (Mestre em Ciências) -Faculdade de Filosofia Ciência e letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2015.

SIVASANKARAN, C., RAMANUJAM, P., SHANMUGAM, S., SATHENDRA, R. E., BALASUBRAMANIAN, B., & MANI, J. Comparative study on *Candida* sp for the production glycerol. **Int. J of Chemtech Research**, v. 6, p. 5058 - 5063, 2014.

SMUGA-KOGUT, M., ZGÓRSKA, K., KOGUT, T., KUKIELKA, K., WOJDALSKI, J., KUPCZYK, A., DRÓZDŹ, B. & WIELEWSKA, I. The use of ionic liquid pretreatment of rye straw for bioethanol production. **Fuel**, v. 191, p. 266-274, 2017.

STAMBUK, B. U., FRANDEN, M. A., SINGH, A., & ZHANG, M. D-Xylose Transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 105-108, p. 255-263, 2003.

SUN, Z., SHUPE, A., LIU, T., HU, R., AMIDON, T. E., & LIU, S. Partirle properties of sugar maple hemicellulose hydrolysate and its influence on growth and metabolic behavior of *Pichia stipitis*. **Bioresource technology**, v. 102, n. 2, p. 2133-2136, 2011.

SUPRAPTA, D. N.; ARAI, K.; IWAI, H. Effects of volatile compounds on arthrospore germination and mycelial growth of *Geotrichum candidum* citrus race. **Mycoscience**, v. 38, n. 1, p. 31-35, 1997.

SYVERSON, R. E. Variable assimilation of carbon compounds by *Candida albicans*. **Journal of clinical microbiology**, v. 13, n. 1, p. 163-166, 1981.

TAHERZADEH, M. J.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Acetic acid—friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*?. **Chemical Engineering Science**, v. 52, n. 15, p. 2653-2659, 1997.

TAVARES, B.; SENE, L.; CHRIST, D. Valorization of sunflower meal through the production of ethanol from the hemicellulosic fraction. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 11, p. 1036-1042, 2016.

TEIXEIRA, T. S.; SIQUEIRA, F. G.; BATISTA, R. D. Enzimas microbianas de desconstrução da parede celular: novas abordagens. **Revista Eletrônica de Energia**, v. 6, n. 1, 2017.

THORNTON, C. R.; SLAUGHTER, D. C.; DAVIS, R. M. Detection of the sour-rot pathogen *Geotrichum candidum* in tomato fruit and juice by using a highly specific monoclonal antibody-based ELISA. **International journal of food microbiology**, v. 143, n. 3, p. 166-172, 2010.

TOQUERO, C. & BOLADO, S. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 69-76, 2014.

UDEH, B. A. & ERKURT, E. A. Compositional and structural changes in *Phoenix canariensis* and *Opuntia ficus-indica* with pretreatment: Effects on enzymatic hydrolysis and second generation ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 702-707, 2017.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Etanol de segunda geração ainda não decolou**. São Paulo: UNICA, 2016. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/namidia/7657299920323122056/etanol-de-2-por-centoC2-por-centoAA-geracao-ainda-nao-decolou-/>> Acesso em: 22/05/2017.

VAITHANOMSAT, P.; CHUICHULCHERM, S.; APIWATANAPIWAT, W. Bioethanol production from enzymatically saccharified sunflower stalks using steam explosion as pretreatment. In: **Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology**. p. 140-143, 2009.

VALINHAS, R. V. **Isolamento, seleção e identificação de leveduras selvagens com capacidade para conversão de xilose a etanol**. 2016. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biocombustíveis) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, *Campus JK*, Minas Gerais, 2016.

VAN DER POL, E. C., BAKKER, R. R., BAETS, P., & EGGINK, G. By-products resulting from lignocellulose pretreatment and their inhibitory effect on fermentations for (bio) chemicals and fuels. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 23, p. 9579-9593, 2014.

VAN SOEST, P. J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its applications to forage. **J. Ann. Sci.**, v. 26, p. 119-128, 1967.

VAN SOEST, P. J. & MOORE, L. A. New chemical method for analysis of forages for the purpose of predicting nutritive value. **Proc. IX inter. Grass. Gong. São Paulo**, p. 783-789, 1966.

VIKARI, L.; VEHMAANPERA, J.; KOIVULA, A. Lignocellulosic ethanol: From science to industry, **Biomass and Bioenergy**, p. 1-12, 2012.

VISSER, E. M., OLIVEIRA FILHO, D., MARTINS, M. A., & STEWARD, B. L. Bioethanol production potential from Brazilian biodiesel co-products. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 489-494, 2011.

VON DE KAMER S. B. & VAN GINKEL, L. Rapid determination of crude fiber in cereals. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 19, n. 4, p. 239-251, 1952.

VOHRA, M., MANWAR, J., MANMODE, R., PADGILWAR, S., & PATIL, S. Bioethanol production: Feedstock and current technologies. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, p. 573-584, 2014.

WALTON, S.; VAN HEININGEN, A.; VAN WALSUM, P. Inhibition effects on fermentation of hardwood extracted hemicelluloses by acetic acid and sodium. **Bioresource technology**, v. 101, n. 6, p. 1935-1940, 2010.

WAN, C.; ZHOU, Y.; LI, Y. Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6254-6259, 2011.

WANG, S.; HE, Z. & YUAN, Q. Xylose enhances furfural tolerance in *Candida tropicalis* by improving NADH recycle. **Chemical Engineering Science**, v. 158, p. 37-40, 2017.

WIMALASENA, T. T., GREETHAM, D., MARVIN, M. E., LITI, G., CHANDELIA, Y., HART, A., LOUIS, E.J., PHISTER, T. G., TUCKER, G.A. & SMART, K. A. Phenotypic characterisation of *Saccharomyces* spp. yeast for tolerance to stresses encountered during fermentation of lignocellulosic residues to produce bioethanol. **Microbial cell factories**, v. 13, p. 1-13, 2014.

YAN, J., YANG, J., XU, L., & YAN, Y. Gene cloning, overexpression and characterization of a novel organic solvent tolerant and thermostable lipase from *Galactomyces geotrichum* Y05. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 49, n. 1, p. 28-35, 2007.

YU, S.; DESAI, S.; RAO, L. V. Ethanol production from lignocellulosic substrate *Prosopis juliflora*. **Renewable Energy**, v. 103, p. 701-707, 2017.

YUCEL, H. G. & AKSU, Z. Ethanol fermentation characteristics of *Pichia stipitis* yeast from sugar beet pulp hydrolysate: Use of new detoxification methods. **Fuel**, v. 158, p. 793-799, 2015.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 17-34, 2001.

ZAMAN, S., LIPPMAN, S. I., ZHAO, X., & BROACH, J. R. How *Saccharomyces* responds to nutrients. **Annual review of genetics**, v. 42, p. 27-81, 2008.

ZHANG, Y.; HAN, B.; EZEJI, T. C. Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural (HMF) by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 during butanol fermentation. **New biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 345-351, 2012.

ZHANG, K.; PEI, Z.; WANG, D. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: a review. **Bioresource technology**, v. 199, p. 21- 33, 2016.

ZHENG, Y.; PAN, Z; ZHANG, R Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International journal of agricultural and biological engineering**, v. 2, n. 3, p. 51-68, 2009.

ZHUANG, X., WANG, W., YU, Q., QI, W., WANG, Q., TAN, X., ZHOU, G. & YUAN, Z. Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 68-75, 2016.

ZHUGE, J., FANG, H. Y., WANG, Z. X., CHEN, D. Z., JIN, H. R., & GU, H. L. Glycerol production by a novel osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 55, n. 6, p. 686-692, 2001.

ZUCARO, A., FORTE, A., BASOSI, R., FAGNANO, M., & FIERRO, A. Life Cycle Assessment of second generation bioethanol produced from low-input dedicated crops of *Arundo donax* L. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 589-599, 2016.

